

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



**ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE DIFERENTES
PATÓGENOS RESPIRATORIOS: APORTACIONES
MICROBIOLÓGICAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR
Almudena Calvo Zamorano

Bajo la dirección del doctor
José Prieto Prieto y María Luisa Gómez-Luz Centelles

Madrid, 2008

- **ISBN: 978-84-692-1745-0**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I



**Estudio de la prevalencia de
diferentes patógenos respiratorios:
aportaciones microbiológicas**

TESIS DOCTORAL

Almudena Calvo Zamorano
Madrid, 2008

JOSÉ PRIETO PRIETO, Catedrático del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y M^a LUISA GÓMEZ-LUZ CENTELLES, Profesora Titular del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada: “Estudio de la prevalencia de diferentes patógenos respiratorios: aportaciones microbiológicas”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por Dña. Almudena Calvo Zamorano en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la UCM, y estimando que encuentra finalizada y en condiciones de optar al grado de Doctor por la Complutense, se solicita sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

Madrid, a 22 de Mayo de 2008

Prof. Dr. José Prieto Prieto

Prof. Dra. M^a Luisa Gómez-Lus Centelles

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Profesor Doctor José Prieto Prieto y a la Profesora Doctora M^a Luisa Gómez-Lus Centelles, por la confianza que depositaron en mí, brindándome la oportunidad de formarme como investigadora y realizar esta tesis bajo su dirección. Por la profesionalidad y dedicación con que han dirigido este trabajo y por el gran apoyo que me han demostrado en todo momento, y por sus siempre optimistas consejos.

A la Dra. Carmen Ramos, por sus constantes ánimos y su gran apoyo.

Y como no, a todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Microbiología I, que de una u otra forma me han ayudado en la realización de esta tesis: Luis y David (por su confianza y ayuda), Maite (por el último empujón imprescindible), Natalia (por los buenos momentos compartidos), Raquel, Eva, Beatriz, Fabio, Olatz, Martha, con ellos he compartido horas de trabajo y buenos momentos de sobremesas.

A todos mis amigos, que han estado conmigo en los buenos y malos momentos por los que he ido pasando durante la elaboración de este largo proyecto.

Muy especialmente a mis padres y mi hermana, a los que dedico este trabajo, por su incondicional apoyo, dedicación y generosidad.

Y a todos los que, de algún modo, han contribuido a que esta Tesis Doctoral viese la luz.

A mis padres y mi hermana

Abreviaturas

ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BLNAR	Betalactamasas negativas ampicilina resistentes
CFL	Líquido cefalorraquídeo
CI	Aclaramiento
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetro
C_{máx}	Concentración máxima
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMI₅₀	CMI para el 50% de la población
CMI₉₀	CMI para el 90% de la población
C_{últ}	Última concentración de fármaco detectada
L	Litro
Log	Logaritmo decimal
M	Molar
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NCCLS	National Comité for Clinical Laboratory Standard
nm	Nanómetro
PBP	Proteína de unión a penicilina
PFGE	Electroforesis en Campo Pulsante
rpm	Revoluciones por minuto
T_{1/2}	Vida media
T_{máx}	Tiempo al que se alcanza la C _{máx}
T_{últ}	Último tiempo en que se detecta concentración de fármaco

U	Unidad
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltios
V_d	Volumen de distribución
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
λ	Lambda
μg	Microgramos
μl	Microlitros

Índice

<u>Introducción:</u>	1
1. Infecciones respiratorias en la comunidad.	2
1.1. Patógenos más frecuentes en las infecciones respiratorias en la comunidad.	3
<i>S. pneumoniae</i>	3
<i>S. pyogenes</i>	4
<i>H. influenzae</i>	4
<i>M. catarrhalis</i>	5
1.2. Variación de la resistencia en estos patógenos	5
2. <i>S. pneumoniae</i>	9
2.1. Características microbiológicas de <i>S. pneumoniae</i>	9
2.2. Mecanismos de patogenicidad de <i>S. pneumoniae</i>	11
2.3. Análisis estructural de <i>S. pneumoniae</i>	12
2.4. Epidemiología y distribución de serotipos	17
2.5. Tratamiento antibiótico	19
2.5.1. Antibióticos betalactámicos	19
Amoxicilina	20
Ácido Clavulánico	21
Amoxicilina/ácido clavulánico	22
2.5.2. Mecanismos de resistencia en <i>S. pneumoniae</i>	23
2.6. Farmacología de los antimicrobianos.	25
2.6.1. Parámetros farmacocinéticas	26
2.6.2. Parámetros farmacodinámicos	28
2.7. Prevención de la infección producida por <i>S. pneumoniae</i> .	31
2.7.1. Vacunas polisacarídicas	32

2.7.2. Vacunas conjugadas	33
<u>Objetivos</u>	36
<u>Material y métodos:</u>	39
1. Estudio de la sensibilidad	40
1.1. Centros colaboradores	40
1.2. Aislados bacterianos	41
1.3. Recogida y transporte al laboratorio central	42
1.4. Agentes antimicrobianos	42
1.5. Estudio de sensibilidad	45
1.6. Análisis estadístico	46
2. Estudios de caracterización molecular mediante electroforesis en campo pulsado.	47
2.1. Aislados bacterianos	47
2.2. Experimento	48
3. Simulaciones farmacodinámicas (Cobertura por simulación por SR.)	53
3.1. Aislados bacterianos.	53
3.2. Agente antimicrobiano	53
3.3. Estudio de sensibilidad	53
3.4. Sistema cinético <i>in vitro</i>	54
3.5. Simulaciones farmacocinéticas	57
3.6. Experimento	59
3.7. Análisis farmacocinético	60
3.8. Análisis estadístico	62

<u>Resultados:</u>	64
1. Determinación de la sensibilidad de nueve antimicrobianos frente a patógenos respiratorios.	65
Número de aislados y distribución geográfica	65
<i>S. pneumoniae</i>	66
<i>S. pyogenes</i>	74
<i>H. influenzae</i>	75
<i>M. catarrhalis</i>	78
2. Estudio para la caracterización molecular de cepas de <i>S. pneumoniae</i> resistentes a amoxicilina.	79
Relación entre la CMI a amoxicilina y los tipos clonales:	
a) Según la CMI a amoxicilina	84
b) Según el tipo clonal	85
3. Estudio PK/PD de amoxicilina SR 2000mg y amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg.	88
3.1. Estudios de sensibilidad	88
3.2. Estudios farmacocinéticos	90
3.3. Farmacodinámica en el sistema <i>in vitro</i> .	93
a) Actividad antimicrobiana de amoxicilina SR 2000 mg y amoxicilina/ ácido clavulánico 875/125 mg (media \pm SD).	93
b) Farmacodinámica comparativa de ambas formulaciones.	101
c) Estudio de los posibles recrecimientos bacterianos (Selección de R)	102
<u>Discusión</u>	104
<u>Conclusiones</u>	124
<u>Bibliografía</u>	128

Introducción

1. Infecciones respiratorias en la comunidad.

Las infecciones respiratorias son una causa importante de morbilidad y mortalidad en la comunidad en todo el mundo. Estas infecciones constituyen uno de los principales motivos de consulta en Atención Primaria de Salud (Romero-Vivas, J. y cols., 1997) como en los servicios de urgencias hospitalarias (Emergencias. 2000), donde al menos el 60% de los pacientes que acuden a consulta son debidos a problemas infecciosos, de los que aproximadamente dos de cada tres son de tipo respiratorio (Picazo, JJ. y cols., 2003). Sólo estas infecciones respiratorias representan el 80% del consumo antibiótico que se realiza a nivel extrahospitalario (Huovinen, P. y Cars, O., 1998).

En Atención Primaria la prescripción de antibióticos por parte de los facultativos se realiza de una manera empírica debido a la falta de diagnóstico microbiológico del agente causal responsable del proceso infeccioso, por ello las recomendaciones de terapia empírica suelen basarse en consensos más que los resultados encontrados en estudios clínicos (Ripoll, MA., y cols., 2008).

La selección de un antimicrobiano concreto se rige por una serie de criterios, no siempre bien conocidos ni definidos, entre los que se incluyen la percepción de efectividad, el conocimiento de las recomendaciones de terapia empírica, la opinión respecto a la etiología más probable, resistencias bacterianas esperables, así como la sensibilidad esperada de los patógenos que con mayor probabilidad son los responsables de la misma, el conocimiento de los diferentes antimicrobianos, la consideración de algunos aspectos relacionados con el paciente (alergias, comorbilidad, etc), experiencia previa, etc. (Ripoll, MA., y cols., 2008).

1.1. Patógenos más frecuentes en las infecciones respiratorias en la comunidad.

Las bacterias que con más frecuencia son aisladas en estas infecciones respiratorias, va a depender fundamentalmente de la localización de las mismas (hospitalaria o comunitaria) y de determinados factores epidemiológicos (Donowitz, G. y cols., 2000). No obstante, los agentes etiológicos más habituales en las infecciones respiratorias comunitarias son *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* entre los grampositivos, y *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*) entre los gramnegativos.

S. pneumoniae

S. pneumoniae sigue constituyendo una causa importante de infecciones adquiridas en la comunidad, incluyendo neumonía, otitis media, sinusitis, meningitis bacteriana aguda (Mufson, MA. 1990), y tras *H. influenzae*, es responsable de las reagudizaciones bacterianas agudas de bronquitis crónica (Oteo, J. y cols., 2001 b). La tasa de mortalidad en pacientes adultos que sufren neumonía neumocócica grave o meningitis puede alcanzar hasta un 30 %. También se encuentra en un alto porcentaje (40%) en la otitis media (Fernández Roblas, R. y cols., 2000).

En este microorganismo es importante subrayar cómo la incidencia de los distintos patrones de resistencia antibiótica varía en función de distintos factores como pueden ser la edad del paciente, la muestra de la que se obtiene y el origen geográfico del aislamiento (García-Rey, C. y cols, 2002).

Durante los últimos años, se han observado cambios significativos en la epidemiología de las infecciones neumocócicas: en primer lugar, la aparición de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina y otros antimicrobianos, lo que ha complicado el tratamiento de dichas infecciones; en segundo lugar el aumento en la prevalencia de las infecciones neumocócicas en grupos específicos de pacientes

como los infectados por VIH (virus de la inmunodeficiencia adquirida) y otros estados de inmunosupresión; y por último, la edad avanzada de la población, ya que los ancianos presentan alto riesgo de sufrir infecciones neumocócicas.

S. pyogenes

S. pyogenes (estreptococo betahemolítico del grupo A) es un agente etiológico de una gran variedad de procesos que se diferencian por su gravedad. Desde procesos más o menos banales como la faringoamigdalitis aguda hasta cuadros graves con elevada mortalidad como la fascitis necrosante y el shock tóxico estreptocócico.

Desde 1985 ha adquirido un mayor protagonismo debido al aumento registrado en la incidencia de infecciones graves por este microorganismo, así como a la reaparición de brotes de fiebre reumática en algunos países. Las infecciones más frecuentes que produce en la comunidad por orden de frecuencia, son: faringitis, infecciones cutáneas (impétigo y erisipela) y de tejidos blandos, sepsis puerperal, neumonía, endocarditis, meningitis y artritis. Incluso origina cuadros de fiebre escarlatiniforme y el síndrome del shock tóxico, debidos a cepas productoras de toxinas.

H. influenzae

H. influenzae es un importante patógeno causante de infecciones del aparato respiratorio superior e inferior y de cuadros invasores graves, fundamentalmente en niños menores de 5 años. Entre las infecciones más frecuentes que produce se encuentran la otitis media aguda, sinusitis aguda, neumonía adquirida en la comunidad y es la primera causa de las exacerbaciones agudas de bronquitis crónica (30-35%) (Barberan, J. y cols., 2004).

Este microorganismo forma parte de la microbiota normal del tracto respiratorio. Los cuadros respiratorios, aunque menos dramáticos que los invasores, representan un gran problema médico sanitario debido a su elevada frecuencia y al importante incremento de resistencia a la ampicilina, antimicrobiano de elección desde la década de 1960.

M. catarrhalis

M. catarrhalis es un patógeno oportunista exclusivo en humanos que produce un amplio rango de infecciones que van desde infecciones agudas localizadas tales como sinusitis, laringitis, traqueítis, otitis media y bronconeumonía, hasta infecciones sistémicas graves incluyendo sepsis, endocarditis y meningitis.

Los porcentajes de colonización generalmente son variables ya que dependen de diversos factores como son la edad, estado de salud, factores socio-económicos, localización geográfica o incluso las variaciones estacionales.

1.2. Variación de la resistencia en estos patógenos

La resistencia de los principales patógenos procedentes de infecciones del tracto respiratorio adquiridas en la comunidad frente a los antimicrobianos comúnmente usados, ha aumentado espectacularmente en las últimas décadas. De especial interés, es el constante incremento de la prevalencia de resistencia a la penicilina y macrólidos en ***S. pneumoniae***, agente implicado con mayor frecuencia en las infecciones del tracto respiratorio (Bal, P. y cols., 2002).

Los estudios de resistencia de *S. pneumoniae* a múltiples antimicrobianos deben realizarse regularmente, ya que existen muchas variaciones anuales y regionales, y las tendencias son variables según los diferentes países, como indican diferentes estudios multicéntricos realizados en América, Asia y Europa.

En general, para *S. pneumoniae* se puede observar una distribución geográfica variable de esta resistencia, con países tales como Taiwan, Hong Kong, México, USA, República Eslovaca, Francia y España mostrando elevados porcentajes de cepas con sensibilidad intermedia o resistente (Hsueh, P. y cols., 2000, Thornsberry, D., y cols. 1999), mientras que países como Reino Unido, Alemania, Holanda, Italia, Bélgica y los países del norte de Europa presentan cifras claramente inferiores (Felmingham, D. y cols., 2000).

En nuestro país, los aislados con CMI $\geq 0,12$ mg/l a penicilina han aumentado desde un 6% en 1979 a más del 40% diez años más tarde (Fenoll A, 1991). Esto se puede ver en un estudio nacional donde se han encontrado porcentajes del 36,5% de cepas resistentes (Baquero, F. y cols., 1999). No obstante, hay que resaltar que en los últimos años se ha observado un descenso de la resistencia a penicilina (Pérez-Trallero, E., y cols., 2005).

No menos importante es el incremento en la resistencia a macrólidos de este microorganismo comúnmente asociado a la resistencia frente a betalactámicos (Granizo. JJ. y cols., 2000, Pérez-Trallero, E., y cols., 2005), donde países con elevados porcentajes de resistencia a penicilina a su vez muestran alto porcentaje de resistencia a macrólidos, como ocurre en Francia, España y Hong Kong (Felmingham, D. y cols., 2000).

A diferencia de otros microorganismos que causan infecciones del tracto respiratorio, *H. influenzae* se ha convertido en un importante patógeno debido al incremento de las cepas productoras de betalactamasas. Los primeros aislados resistentes a la ampicilina por producción de betalactamasas se caracterizaron en los años 1970 (Khan, W., y cols. 1974; Gunn, BA., y cols. 1974). En España, las primeras cepas se detectaron en 1982, desde ese momento estas cepas se han aislado con frecuencia en países como USA, Hong Kong, Francia y España, que siguen siendo los

países con mayores porcentajes de aislados resistentes (Felmingham, D. y cols., 2000), hasta quedar estabilizada en los últimos años a valores aproximados al 25% según determinados estudios llevados a cabo en nuestro país (Marco, F., y cols., 2001; Aracil, C. y cols., 2003).

La resistencia a betalactámicos se complica por el descubrimiento de cepas de *H. influenzae* que no producen betalactamasas, pero que sin embargo son resistentes a la ampicilina y a la amoxicilina debido a la alteración de sus proteínas de enlace a la penicilina (BLNAR), aunque los porcentajes encontrados a nivel mundial no son altos sino más bien bajos (0,3%), es necesario estar en continua vigilancia (Felmingham, D. y cols., 2000).

En el caso de ***S. pyogenes***, es importante destacar que no se ha descrito ningún aislado de *S. pyogenes* resistente a la penicilina, a pesar del uso que se ha hecho de los antibióticos betalactámicos. Incluso hay estudios que muestran que la sensibilidad *in vitro* de este patógeno a penicilina no ha variado significativamente en los últimos 80 años (Macris, MH. y cols., 1998). También se mantiene sensible al resto de betalactámicos, en menor medida que a la penicilina, como ocurre principalmente con las cefalosporinas orales (Baquero, F. y cols., 1999).

Aunque mantiene su total sensibilidad a penicilina, el principal problema radica en el aumento de porcentajes de resistencia a macrólidos. En nuestro país, el uso de estos agentes en el tratamiento de las infecciones comunes como faringitis, es responsable del 15-25% de cepas resistentes (Alos, JI. y cols., 2000; Baquero, F. y cols., 1999 b; Romero-Vivas, J. y cols. 1997). Esto es importante porque todos los macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono están afectados en la misma magnitud, mientras que miocamicina (macrólido con anillo de 16 átomos de carbono) y clindamicina (lincosamida) mantienen una buena actividad frente a cepas que muestran el fenotipo M (Alos, JI. y cols., 2000).

Finalmente, ***M. catarrhalis*** es también un importante patógeno que causa infecciones como exacerbación aguda de bronquitis crónica. Presenta resistencias frente a betalactámicos mediante un mecanismo de resistencia conocido, como es la producción de betalactamasas (Felmingham, D. y cols., 2000). En 1977, estudios Europeos indicaron que el 4% de este microorganismo producía betalactamasas, apenas dos años después, la tasa era del 17%, hoy día, más del 90% de las cepas muestran este mecanismo. Pero la necesidad de un mejor conocimiento sobre sus perfiles de sensibilidad a los agentes antimicrobianos comunes hacen necesario incluirlos en estudios de sensibilidad.

2. *Streptococcus pneumoniae*.

Para comprender mejor el mecanismo de resistencia frente a los antibióticos se deben revisar algunos aspectos **microbiológicos, bioquímicos y fisiológicos** del neumococo.

2.1. Características microbiológicas de *S. pneumoniae*

S. pneumoniae o también denominado coloquialmente neumococo fue aislado por primera vez en conejos inyectados con saliva humana por Pasteur en 1881, quien lo denominó *Microbe septicémique du salive*, y también por Sternberg, quien lo denominó *Micrococucs pasteurii* simultáneamente (Sternberg, GM., 1881), fue denominado por Fraenkel, en 1886, *Pneumococcus* (Austrian, R., 1981). En 1901 Chester le designó con el nombre de *S. pneumoniae*. Posteriormente, en el año 1920, esta denominación cambio a *Diplococcus pneumoniae* debido a su morfología característica. Nuevamente, en 1974 pasó a denominarse *S. pneumoniae* por sus numerosas similitudes con otros estreptococos (denominación aún vigente).

Se trata de un microorganismo cuyo único reservorio natural es la nasofaringe humana y su mecanismo de transmisión es de persona a persona a través de las secreciones respiratorias.

Se caracteriza por ser un coco grampositivo a la tinción de Gram, de tamaño de 0,5-1,25 μm de diámetro, normalmente de morfología esférica u oval que se observan al microscopio agrupados en parejas (diplococos) o cadenas por su extremo distal. La longitud de las cadenas es variable entre las distintas especies y cepas, según la composición del medio donde han sido aislados. La morfología de las colonias varía en presencia o no de cápsula. En un cultivo las cepas encapsuladas aparecen grandes, redondas y mucoides, sin embargo las colonias en las cepas no encapsuladas son más pequeñas y aparecen planas. Entre otras características

microbiológicas figuran que es catalasa negativo y anaerobio facultativo, inmóvil y no es formador de esporas. Para su crecimiento requiere de un medio complejo con sangre (la presencia de eritrocitos inactiva el peróxido de hidrógeno, producto final del metabolismo bacteriano, y aumenta su crecimiento) una temperatura de unos 37°C y una atmósfera con un 5% de CO₂ (García Rodríguez, JA. y cols., 1996, Murray, PR. y cols., 2006).

El polisacárido capsular permite clasificar en serotipos a los neumococos, en base a sus diferencias antigénicas tipoespecíficas en su cápsula. Estos serotipos se pueden identificar mediante distintos métodos basados en la reacción antígeno anticuerpo, utilizando antisueros específicos. El método más utilizado y aceptado mundialmente es el de Quellung (Austrian, R., 1976), se pueden utilizar también las reacciones de aglutinación macroscópica simple. Se han llegado a describir alrededor de 90 serotipos (Musher, DM., 2000), a los cuales nos referiremos con la nomenclatura danesa, aceptada a nivel mundial desde principios de la década de 1980, que les clasifica en serogrupos/serotipos de acuerdo a sus características estructurales y antigénicas. Algunos serogrupos incluyen distintos serotipos serológicamente relacionados. También se pueden emplear pruebas de aglutinación en látex (Park, MK. y cols., 2000) y coaglutinación (Lalitha, MK. y cols., 1999) este último utilizado por su menor coste en los estudios epidemiológicos realizados en países en desarrollo. Otros métodos más sofisticados emplean la electroforesis de pulsos sobre gel (Lefevre, JC. y cols., 1996) o la reacción en cadena de la polimerasa. El método más avanzado utiliza electroforesis de enzimas multilocus (Enright, MC. y cols., 1999 b), los genotipos determinados por este sistema presentan una alta concordancia con los serotipos determinados con la reacción de Quellung aunque hay alguna excepción debido a los cambios capsulares.

Este serotipaje fue de gran relevancia en los 30 años, cuando se utilizaban como tratamientos los antisueros, pero actualmente también requiere interés para los estudios epidemiológicos, así como para la preparación de vacunas.

2.2. Mecanismos de patogenicidad de *S. pneumoniae*

Este microorganismo posee una serie de características que le facilitan la colonización de una gran variedad de nichos ecológicos, encontrándose la mayoría en la nasofaringe en un porcentaje de al menos el 40% de la población general (Hendley, JO. y cols., 1975).

Las personas por lo general son portadoras asintomáticas de neumococos en la mucosa de las vías respiratorias superiores, pero sólo una pequeña proporción de la población desarrolla enfermedad.

Durante la infección por *S. pneumoniae* el primer paso es la capacidad de adherirse eficazmente a las células diana, interaccionando íntimamente con receptores específicos de las células epiteliales del mucus del tracto respiratorio, mediante una adhesina de naturaleza química todavía desconocida, para proceder a su invasión posterior. Como consecuencia de esta interacción se produce un daño en la actividad de los cilios del epitelio respiratorio.

La patogenicidad de este microorganismo se atribuye a varias de sus estructuras, de las que la mayoría se encuentran situadas en su superficie bacteriana, pero el principal factor de virulencia del neumococo es la cápsula polisacarídica. También existen otros factores extracelulares e intracelulares implicados en la patogénesis de la enfermedad neumocócica (García-Suárez, MM. y cols., 2006), como son los componentes de la pared celular, las proteínas fijadoras de colina, las proteínas de unión a penicilina, las hemolisinas, la neuraminidasa, la IgA proteasa y el pili neumocócico entre otros.

A veces esta colonización induce una respuesta inmune que puede llegar a detener el proceso infeccioso. No obstante, la virulencia de *S. pneumoniae* viene determinada por la capacidad de este microorganismo de resistir a la fagocitosis así como su actuación de una intensa respuesta inflamatoria.

2.3. Análisis estructural de *S. pneumoniae*.

S. pneumoniae se caracteriza por presentar la estructura clásica de las bacterias grampositivas, en la que se diferencian la **cápsula**, **pared celular** y la **membrana plasmática**. La presencia de la cápsula es una de las estructuras más importantes de este microorganismo, ya que puede llegar a inducir la respuesta inmune y según su composición se han llegado a descubrir al menos 90 serotipos capsulares diferentes basados en la composición polisacárida de la misma, que constituyen la base del sistema de clasificación serológica del neumococo (Henrichsen, J., 1995; Llull, D. y cols., 2001).

Además de esta envuelta, como ya hemos comentado antes, existen otras estructuras que son la pared celular y la membrana citoplasmática, que también presentan en su composición elementos antigénicos relacionados con la patogénesis del neumococo (Tabla 1).

2.3.1. Cápsula

Esta cápsula externa, compuesta por polisacáridos complejos de alto peso molecular con capacidad antigénica (Avery, OT. y Heidelberger, M. 1925), es una de las estructuras más importantes ya que en ausencia de anticuerpos específicos es responsable de (Morona, JK. y cols., 2006):

- la resistencia a la fagocitosis (Nelson, AL. y cols., 2007), debido a su capacidad para bloquear el reconocimiento del neumococo por parte del huésped,

- la degradación de los componentes del complemento y,
- de la pérdida de la actividad de la ruta alternativa del complemento.

Por esta razón, la virulencia e invasividad del neumococo depende de la composición química, en mayor medida, y de la cantidad de polisacárido capsular producido y varían por tanto entre los diferentes serotipos.

Los polisacáridos polianiónicos (Nelson, AL. y cols., 2007) modulan el paso de las moléculas e iones a la pared celular, la adherencia de la bacteria a superficies biológicas e inorgánicas, así como la formación de biopelículas y microcolonias (Hammerschmidt, S. y cols., 2005; Kamerling, JP., 2000).

Generalmente los neumococos que carecen de cápsula no son virulentos (Watson, DA. y cols., 1990) y los anticuerpos anti-polisacárido capsular son protectores (Shurin, PA. y cols., 1993).

2.3.2. Pared celular. Polisacárido C.

Posee una pared celular que rodea a la membrana citoplasmática y confiere a la bacteria una morfología típica de las bacterias grampositivas, compuesta principalmente por peptidoglicano, constituido por largas cadenas de polisacárido unidos por enlaces peptídicos. Éste consiste en unidades alternas de residuos de N-acetilglucosamina (NAG) y N-acetilmurámico (NAM) con ácidos teicoicos anclados a la membrana celular mediante enlaces fosfodiéster.

El peptidoglicano tiene un papel fundamental en la estimulación de la respuesta inflamatoria. El polisacárido C actúa mediante la activación de la vía alternativa del complemento, a través de su componente de fosforilcolina. Los anticuerpos frente al polisacárido C aparecen en los primeros años de vida aunque no protegen frente a la infección neumocócica (Musher, DM. y cols., 1990).

2.3.3. Membrana citoplasmática.

En esta membrana se encuentran localizadas una serie de proteínas a las que se atribuyen actividades enzimáticas importantes, como son las autolisinas, endonucleasas, proteínas activadoras e inhibidoras y proteínas fijadoras de penicilina (PBPs o penicilin binding proteins) (Lacks, S. y Neuberger, M. 1975; Horne, D. y cols., 1974; Williamson, R., y cols. 1980).

Factores implicados en la patogenia de *S. pneumoniae*:

- Adhesina A (PsaA). Lipoproteína de superficie, que forma parte de un sistema de transporte de membrana pasivo específico (difusión facilitada) actuando como permeasa (facilitador). Aunque según Jedrzejak (Jedrzejak, MJ., 2001) no es una adhesina, y formaría parte de un sistema transportador que introduce manganeso y zinc al citoplasma bacteriano.
- Proteínas Fijadoras de Colina:
 - Proteína fijadora de colina A (CbpA) ó proteína de superficie C (Psp C), esencial para la colonización neumocócica.
 - Proteína de superficie A o antígeno A protector (PspA), es antigénicamente variable, proteína transmembrana, permite la captación de hierro por parte del neumococo facilitando la supervivencia e invasión del huésped. Está considerada como componente de una posible vacuna (Nabors, GS. y cols., 2000).
 - Hialuronidasa ó hialuronato liasa (Hyl), es una de las proteínas más abundantes de superficie de *S. pneumoniae*, se trata de una enzima que facilita la invasión neumocócica mediante la degradación del ácido

hialurónico (Jedrzejewski, MJ., 2001). Estas proteínas pueden ser esenciales para la virulencia total del neumococo.

- Neuraminidasas (NanA y NanB), enzimas con capacidad de dañar los tejidos del huésped.
- Neumolisina, citolisina que por la alteración de células epiteliales bronquiales y alveolares facilita la invasión del torrente sanguíneo, favoreciéndose la supervivencia neumocócica, eliminando la actividad antimicrobiana por inhibición de la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos, y la producción de linfocinas incluido el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleucina (IL1).
- Enzimas autolíticas (N-acetil-murámico-alanina amidasa), situadas en la membrana celular, parecen estar relacionadas con el proceso de división bacteriana.
- Proteasa de la inmunoglobulina A (IgA), enzima extracelular que altera la eliminación mediada por la inmunoglobulina A secretora impidiendo el bloqueo de la adherencia.
- Peróxido de hidrógeno, situado en las células epiteliales del huésped.

Tabla 1. Características de los principales factores de virulencia propuestos.

Factores de virulencia	Mecanismo de virulencia propuesto
Cápsula	Falta de activación de la ruta alternativa del complemento Resistencia a la fagocitosis Depósito de componentes del complemento opsómicamente inactivos Inmunogeneidad baja o nula de algunos serotipos
Pared celular	Efectos inflamatorios Activación de la ruta alternativa del complemento, resultando una producción de anafilotoxina Aumento de la permeabilidad vascular, degranulación de los mastocitos, activación de PMN Incremento en la producción de IL-1, citopática para el endotelio Mediador de unión a células endoteliales
Hemolisinas (neumolisinas)	Citolíticos a altas concentraciones Citotóxico a bajas concentraciones Inhibición del movimiento ciliar y alteración del epitelio Inhibición de la actividad bactericida de los PMN Inhibición de la proliferación linfocitaria Inhibición de la síntesis de anticuerpos Activación del complemento Producción: IL-1 β y TNF- α por aumento de monocitos Unión del fragmento Fc de anticuerpos
PspA	Inhibición de la activación del complemento
Componente de unión al factor	Inhibición de la activación del complemento
H del complemento	Inhibición de la fagocitosis
Autolisina	Liberación de neumolisina y productos de la PC
Neuraminidasa	Exposición de receptores por neumococo
Permeasas peptídicas	Aumenta la adhesión
Peróxido de hidrógeno	Daño pulmonar
Proteasa IgA	Contrarresta los mecanismos de defensa mucosos
Pili	Mejora la adherencia

Tomado de Alonso de Velasco, E. y cols., 1995.

2.4. Epidemiología y distribución de serotipos.

S. pneumoniae coloniza el tracto respiratorio superior causando distintas enfermedades graves, siendo transportado asintóticamente en la nasofaringe por un porcentaje elevado de la población (Hendley, JO. y cols., 1975), lo que se denomina estado de portador, que varía con la edad, ambiente y época del año. Se encuentra con mayor frecuencia en edades infantiles, de modo que se ha estimado que entre el 20-40% de los niños sanos son portadores de neumococo (Raymond, J. y cols., 2000). Este estado es más alto durante los meses fríos de invierno y en comunidades cerradas. No obstante, solamente un pequeño porcentaje de la población colonizada desarrolla enfermedad neumocócica.

Los principales grupos de mayor riesgo de estas infecciones son los niños menores de 2 años y los adultos mayores de 60 años de la población (Rijkers, GT. y cols., 1993), así como pacientes inmunocomprometidos con condiciones de predisposición tales como los sometidos a asplenia funcional o a esplenectomía (Aaberge, IS. y Lovik, M., 1996; Shatz, DV., y cols., 1998), enfermedades crónicas o inmunosupresoras, particularmente pacientes con SIDA (Johston, RB Jr., 1991; Musher, DM., 1992).

Destaca por ser el primer agente causal de la neumonía adquirida en la comunidad en los adultos (Klugman, KP. y cols., 2004), la segunda causa de meningitis bacteriana (Gillespie, SH., 1989; Dagan, R. y cols., 1994), y la principal causa de otitis media en los niños (Klein, JO., 1994).

Distribución de serotipos

La variable composición antigénica de *S. pneumoniae* ha permitido describir 90 polisacáridos capsulares química e inmunológicamente distintos, dando lugar a la

clasificación del neumococo en los correspondientes serotipos capsulares (Van Dam JEG. y cols., 1990; Henrichsen, J., 1995). Aunque, sólo 20 de los 90 serotipos descritos actualmente causan el 90% de las enfermedades (Fenoll, A. y cols., 1998).

Los distintos serotipos se van a comportar de manera diferente en cuanto a su capacidad antigénica, virulencia y capacidad colonizadora. Sólo algunos serotipos son los responsables de la mayoría de las enfermedades neumocócicas en el ser humano. Asimismo, estos serotipos varían con la edad, el tiempo, la zona geográfica, el cuadro clínico que producen y la sensibilidad a los antibióticos (Bruyn, GA. y cols., 1992; Davidson, M. y cols., 1994; Trotman, J. y cols., 1995; Levine, MM. y cols., 1998).

Durante los 12 primeros meses de vida del individuo la mayoría de los serotipos colonizan la nasofaringe, aunque estos serotipos son reemplazados posteriormente por otros debido al desarrollo de inmunidad para cada uno de los serotipos que va colonizando (Coles, CL. y cols., 2001). En el caso de los adultos influye la posible exposición al contacto con niños en la comunidad, así los adultos no expuestos al contacto con niños suelen presentar una baja prevalencia de neumococo en su microbiota nasofaríngea (López, B. y cols., 1999; Leino, T. y cols., 2001). Existen otros factores de riesgo para el desarrollo de la infección neumocócica (Shuchat, A. y cols., 2001) entre los que se incluyen el hábito de fumar, tanto de forma activa como pasivamente, así como la presencia de enfermedades crónicas.

La distribución de los serotipos varía no sólo con la edad del individuo sino también con la localización geográfica (Bruyn, GA. y cols., 1992). Realmente la distribución de serotipos es un proceso dinámico debido a una serie de causas como son la difusión clonal (Appelbaum, PC., 1992; Parkinson, AJ. y cols., 1994; Yagupsky y cols., 1998), a la emergencia de nuevos serotipos (Henrichsen, J., 1995) y al intercambio de cápsula entre neumococos (Claverys, JP. y cols., 2000).

Existen diversos trabajos que demuestran el cambio en la distribución de serotipos que causan enfermedad neumocócica invasiva, pasando de los conocidos

como “serotipos epidémicos” 1, 2, 3 y 5 a los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Estos últimos serotipos son los que se localizan en mayor frecuencia en niños portadores sanos menores de tres años (Feikin, DR. y Klugman, KP. 2002) aunque en determinados países desarrollados, niños del mismo rango de edad presentan además los serotipos 1, 3, 5 y 7F (Hausdorff, WP. y cols., 2002).

2.5. Tratamiento antibiótico.

Por norma general *S. pneumoniae* ha sido bastante sensible a numerosos antibióticos (penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, etc.), pero en las dos últimas décadas han ido emergiendo de forma progresiva neumococos resistentes a algunos antibacterianos, e incluso con resistencia a más de un grupo de antibióticos. Para poder evaluar la eficacia terapéutica de los agentes es necesario atender a los factores farmacocinéticos/farmacodinámicos.

En el grupo de los agentes betalactámicos, dentro del grupo de las penicilinas más activas frente a aislados *S. pneumoniae* resistentes a penicilina destacan la ampicilina, la penicilina G y la amoxicilina. Concretamente la amoxicilina presenta una elevada actividad frente a los aislados resistentes a penicilina y es algo más activa que la ampicilina y la penicilina G. Además es el único agente betalactámico oral que mantiene unas concentraciones séricas por encima de la CMI₉₀ durante al menos el 40% del intervalo entre dosis (Appelbaum, A., 2000).

2.5.1. Antibióticos betalactámicos:

El término betalactámico incluye un grupo de antibióticos cuyo origen se remonta al descubrimiento de Fleming en 1928, cuando descubrió que un hongo del

género *Penicillium* producía una sustancia capaz de inhibir el crecimiento del *Staphylococcus aureus*, que denominó penicilina (Barberan, J. y cols., 2003).

El mecanismo de acción de estos antibióticos es la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Son compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, con la particularidad de que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico.

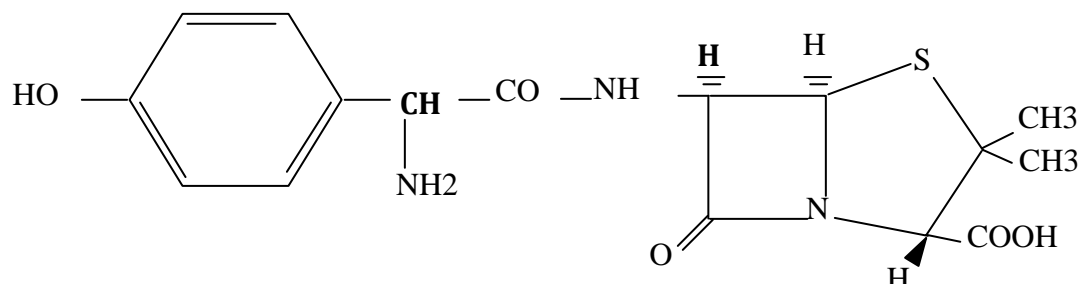
El espectro de estos antimicrobianos se ha ido ampliando por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos gramnegativos a lo largo de los años; aunque también la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. Aun así, la penicilina sigue siendo el tratamiento de elección en un gran número de infecciones clásicas, como son las infecciones respiratorias (García Rodríguez JA. y cols., 2006).

Amoxicilina

Es una penicilina semisintética de amplio espectro que muestra un elevado nivel de actividad bactericida frente a una amplia gama de bacterias grampositivas y gramnegativas, pero es inestable ante la presencia de los enzimas betalactamasas producidos por determinadas bacterias (Gruneberg, RN., 1980; O'Brien, TF. y cols., 1978).

Su estructura química consta de un anillo betalactámico asociado a otro tiazolidínico de cinco componentes, lo que da origen al núcleo responsable de su actividad biológica, el ácido 6-aminopenicilánico, a él se asocia una cadena lateral cuya estructura se representa en la figura 1.

Figura 1. Estructura química de la amoxicilina.

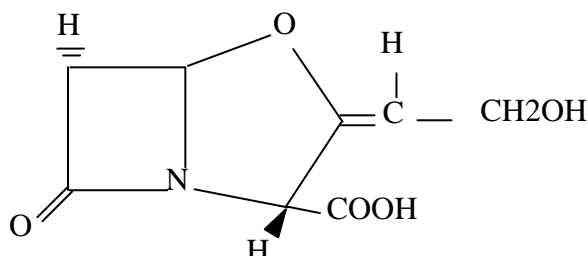


Ácido clavulánico

Es un inhibidor competitivo irreversible de las betalactamasas tanto intracelulares como extracelulares y concentración dependiente (Rollinson, GN., 1994). Su estructura consiste en un núcleo similar al ácido penicilánico de las penicilinas con la sustitución del átomo de azufre en posición 3 por un átomo de oxígeno, y la falta de la cadena lateral en posición 6 (Figura 2). Actúa bloqueando a estas enzimas de forma irreversible y progresiva (Labia, R. y Peduzzi, J., 1978; Reading, C. y Cole, M., 1997), de esta manera con pequeñas concentraciones del fármaco se impiden la acción inactivante de las mismas sobre las penicilinas sensibles a las betalactamasas, presentando en asociación una acción sinérgica (Payne, DJ. y cols., 1994).

Aunque en general, los inhibidores de betalactamasas tienen una baja actividad antibacteriana, el ácido clavulánico muestra actividad sinérgica con amoxicilina y otros betalactámicos, y contribuye en el aumento de las defensas del huésped (Finlay, J. y cols. 2003).

Figura 2. Estructura química del ácido clavulánico.



Amoxicilina/Ácido clavulánico

Consiste en la asociación de ambos fármacos descritos, la amoxicilina y la sal potásica del ácido clavulánico, en diferentes proporciones, las cuales pueden obtenerse en el comercio.

Se trata de un antibiótico de amplio espectro utilizado para el tratamiento de una gran variedad de infecciones bacterianas, que incluyen infecciones respiratorias superiores e inferiores, infecciones de la piel y infecciones de los tejidos blandos.

La actividad de amoxicilina en presencia de ácido clavulánico, frente a las cepas sensibles, no varía respecto a la que se obtiene sólo con amoxicilina. En cambio, en cepas productoras de betalactamasas (tanto grampositivos como gramnegativos) la presencia de ácido clavulánico aumenta significativamente la sensibilidad de esas cepas a la amoxicilina (White, AR., y cols., 1989).

2.5.2. Mecanismos de resistencia en *S. pneumoniae*.

La mayoría de los patógenos han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia frente a estos antibióticos betalactámicos. Uno de los mecanismos de resistencia más frecuentes se debe a la acción de betalactamasas mediadas por plásmidos, sin embargo, en el caso de *S. pneumoniae* los mecanismos de resistencia que presenta frente a los betalactámicos se debe a la alteración o modificación de las PBPs, proteínas enzimáticas que participan en las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano de la pared bacteriana (dianas de los betalactámicos), produciendo la inactivación biológica del antibiótico (Goffin, G. y Guysen, JM., 1998), y también a la producción de mutaciones en determinados genes.

S. pneumoniae contiene 6 PBPs en su estructura bacteriana, cinco PBPs de alto peso molecular (PBP1a, PBP1b, PBP2x, PBP2a y PBP2b) y una de bajo peso molecular (PBP3) (Nagai, K. y cols., 2002). Estas PBP interactúan con los antibióticos betalactámicos formando un complejo covalente con la serina del sitio activo, con lo que impide la formación de la pared celular (Bergmann, C. y cols., 2004; Hakenbeck, R. y cols., 2000). El nivel de resistencia a estos antimicrobianos depende de la acción colectiva de las diferentes PBPs. Las alteraciones de las PBP de alto peso molecular conllevan una disminución de la afinidad de las PBP por la penicilina y demás antibióticos betalactámicos.

Las PBPs involucradas en la resistencia a los betalactámicos son las PBP1a, PBP2a y PBP2x, y las alteraciones en la PBP2b son las directamente responsables de la resistencia a amoxicilina (Nagai, K. y cols., 2002). Para que se produzcan altos niveles de resistencia es necesario que se den varias mutaciones en más de una PBP. En *S. pneumoniae*, alteraciones en la PBP2x y PBP2b confieren baja resistencia y necesitan de mutaciones en otras PBPs para adquirir altos niveles de resistencia (Muñoz, R. y cols., 1992; Grebe, T. y Hakenbeck, R., 1996).

El otro de los mecanismos de resistencia que se han identificado son por mutaciones en dos genes (no PBP), concretamente en una glicosiltransferasa (CpoA) y una histidin protein quinasa (CiaH). Estos genes se encuentran involucrados en la biosíntesis de los componentes de la pared celular como un paso previo a la biosíntesis de las funciones de las PBPs (Hakenbeck, R. y cols., 1999), y estas mutaciones seleccionadas durante el tratamiento con betalactámicos, contrarrestan los efectos causados por la inhibición de las PBPs.

También se ha descrito un mecanismo de resistencia por alteraciones en el operón murMN. En el proceso de biosíntesis de la pared celular intervienen las dos proteínas (murM y murN). La inactivación de este operón está relacionada con la pérdida de resistencia a penicilina (Filipe y Tomasz, 2000; Cafini, F., y cols., 2006) y con la eliminación de los muropéptidos ramificados de la pared celular.

2.6. Farmacología de los antimicrobianos.

El tratamiento empírico de las infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad se basa en la utilización de los tres grupos de antibióticos: agentes betalactámicos, macrólidos y fluoroquinolonas. Cuando se quiere evaluar la eficacia terapéutica de esos agentes antimicrobianos es necesario incluir en consideración la **Farmacodinamia**.

El desarrollo de la farmacodinamia surgió a principios de los años 80 como instrumento de predicción terapéutica de un antimicrobiano frente al incremento constante de las resistencias (Wright, D. H. y cols., 2000), permitiendo el desarrollo de nuevos fármacos y sus respectivas formulaciones, con el fin de establecer las bases para la correcta adecuación de las concentraciones de las dosis y sus intervalos de dosificación.

El conocimiento de estas variables farmacodinámicas para los antimicrobianos permite la optimización de los esquemas de dosificación y la comparación de estas variables entre los distintos agentes antimicrobianos. La farmacología de los agentes antimicrobianos puede dividirse en dos componentes: parámetros **farmacocinéticos**, y parámetros **farmacodinámicos** (PK/PD).

Los parámetros farmacocinéticos están determinados por una serie de procesos que describen la circulación del fármaco por el organismo e incluyen la administración del fármaco, su absorción, distribución (de la sangre a los líquidos intersticiales y al interior de los distintos tejidos), metabolismo, hasta su eliminación (Craig, WA., 1998). El estudiar estas características farmacocinéticas va a determinar la vía de administración, dosificación, así como el ajuste de ambas, según las vías de eliminación del agente antimicrobiano.

Por lo tanto, conlleva el estudio de la curva de la concentración sérica del fármaco respecto al tiempo tras su administración y el desarrollo de modelos matemáticos para predecir tales concentraciones (Danish, M., 1992).

Por otro lado, la **farmacodinamia** determina el efecto farmacológico y toxicológico (Craig, WA., 1998) estudiando la relación entre la concentración del antibiótico en el tiempo y sus efectos, con el fin de evaluar el efecto terapéutico.

Existen diversos parámetros PK/PD de importancia en el tratamiento antimicrobiano para considerar el efecto de un antibiótico sobre las bacterias

2.6.1. Parámetros farmacocinéticos

Estos parámetros permiten determinar los regímenes de dosificación más adecuados del fármaco. Son los siguientes:

- **Concentración máxima (C_{max}):** máxima concentración obtenida después de la administración de una determinada dosis.
- **Biodisponibilidad (F):** cantidad total de antibiótico que se absorbe y alcanza la circulación sistemática de forma inalterada (Soriano, F., 2006).
- **Área bajo la curva (ABC):** área limitada por la curva de concentración de un antibiótico a lo largo del tiempo.
- **Volumen de distribución (V_d):** volumen en el cual la cantidad administrada de fármaco necesitaría estar uniformemente distribuida para que haya una concentración similar.
- **Semivida plasmática (t_{1/2}):** Tiempo en que se elimina un 50% de la dosis administrada.
- **Aclaramiento (Cl):** es el resultado de dividir la tasa de eliminación en relación a la concentración plasmática.
- **Eliminación**

Los procesos que describen la circulación del fármaco por el organismo son los siguientes:

La **absorción** se produce cuando el antibiótico se administra por otras vías diferentes a la intravenosa o en compartimentos acuosos fisiológicos, como en el LCR (líquido ceforraquídeo), como la vía intramuscular, subcutánea, oral o rectal.

Esta absorción depende del propio fármaco (hidrosolubles o lipófilos), de los mecanismos fisiológicos y la situación del paciente. Así, es importante conocer la biodisponibilidad y la variabilidad en la absorción digestiva para los antimicrobianos que se administren por vía oral.

La **distribución** es un proceso por el cual el fármaco pasa desde el compartimento vascular a diferentes órganos y tejidos. Depende del propio fármaco (peso molecular, unión a proteínas, hidrofilia o lipofilia), como de su dosificación y de la situación del paciente.

En este caso es necesario disponer de determinados parámetros farmacocinéticos como son la concentración máxima (C_{max}) después de la administración de una determinada dosis, el tiempo requerido para alcanzar el pico sérico (T_{max}) y la semivida plasmática o vida media ($T_{1/2}$). Pero también es importante conocer el área bajo la curva (ABC), es decir las concentraciones plasmáticas en relación al tiempo, que depende no sólo de la dosis sino también de la vía de administración, así como de otros factores que influyen en la distribución de los fármacos, como puede ser la tasa de unión a proteínas.

El **metabolismo** puede producir transformaciones del medicamento (reacción fase I) produciéndose la activación, inactivación o conversión en otra sustancia con mayor, menor o igual actividad del compuesto original, o puede conjugarse con otras moléculas del huésped (reacción fase II) generalmente se produce la inactivación del compuesto facilitándose su eliminación (Soriano, F., 2006). Algunos antibióticos son

metabolizados en el hígado, otros no sufren ninguna alteración y son eliminados prácticamente inalterados por vía renal.

La **eliminación** puede llevarse a cabo mediante una cinética de orden cero, que implica una eliminación constante, independientemente de su concentración, o una cinética de primer orden, donde la tasa de eliminación es proporcional a la concentración plasmática y está cambiando continuamente.

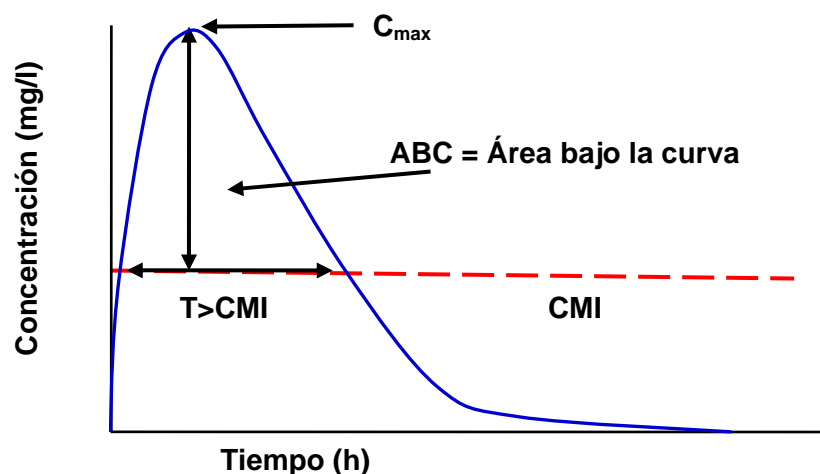
2.6.2. Parámetros farmacodinámicos:

Los antibióticos se pueden clasificar de acuerdo a la actividad y duración del efecto bactericida que presenten en:

- **Fármacos concentración dependientes:** son aquellos antibióticos cuya eficacia se correlaciona con las concentraciones séricas produciendo un efecto persistente o prolongado. Cuanto mayor es la concentración mayor es el efecto bactericida. En este grupo se engloban los aminoglucósidos y las quinolonas.
- **Fármacos tiempo dependientes:** aquellos antibióticos cuya eficacia se correlaciona con el tiempo en que sus concentraciones superan la concentración mínima inhibitoria (CMI). Precisan concentraciones mantenidas en el tiempo ligeramente superiores a la CMI. En este grupo se encuentran los betalactámicos, eritromicina, clindamicina, azitromicina, telitromicina, tetraciclinas, glucopéptidos, quinupristina/dalfopristina y linezolida.

La farmacodinamia estudia la interacción del fármaco con su diana y las células huésped. Los parámetros farmacodinámicos permiten predecir la eficacia terapéutica de los fármacos (Figura 3).

Figura 3. Representación gráfica de los parámetros PK/PD.



Por lo tanto se pueden establecer tres grupos de antibióticos dependiendo del índice farmacodinámico que mejor exprese sus efectos (Barger, A. y cols., 2003). Estos grupos son los siguientes:

1.- Cociente inhibitorio (C_{max}/CMI): es el porcentaje de la concentración sérica máxima del antibiótico que se encuentra por encima de la concentración mínima inhibitoria. Este parámetro predice la eficacia terapéutica de los antibióticos considerados concentración dependientes (fluoroquinolonas, aminoglucósidos y nitroimidazólicos). Presentan un perfil de actividad clínica mayor cuando se administran en dosis elevadas y únicas, con independencia del intervalo de administración. Se consigue una tasa óptima de eficacia cuando el cociente C_{max}/CMI alcanza valores entre 8 y 10 e incluso superiores, ya que se consigue mayor actividad bactericida y un menor riesgo de selección de mutantes resistentes (Azanza, JR., 2005 y Soriano, F., 2006).

2.- Área bajo la curva dividido por la CMI del microorganismo (ABC/CMI)

generalmente en un periodo de 24 h. Este parámetro es el que más se correlaciona con la eficacia de los antibióticos concentración dependientes (fluoroquinolonas (Preston, SL. y cols., 1998), aminoglucósidos, azitromicina, telitromicina, tetraciclinas, glucopéptidos y quinupristina/dalfopristina). Presentan un perfil de distribución muy elevado y sus concentraciones plasmáticas son reducidas. En este caso las tasas por encima de 100 se asocian a una mayor eficacia terapéutica y a un riesgo bajo de selección de mutantes resistentes (Soriano, F., 2006).

3.- El tiempo sobre la CMI ($T > CMI$): porcentaje acumulativo de tiempo en que

la concentración del antibiótico se encuentra por encima de la CMI. Este parámetro predice la eficacia de los antibióticos tiempo dependientes [betalactámicos, macrólidos (excepto azitromicina), clindamicina y oxazolidinonas]. Se considera que el antibiótico puede ser eficaz cuando el valor de $T > CMI$ se sitúe en el 40% o más del intervalo de dosificación (Craig, WA. y Andes, 1996).

2.7. Prevención de la infección producida por *S. pneumoniae*.

El recurso de disponer de una vacuna efectiva frente a la infección ocasionada por *S. pneumoniae* nos ha permitido emplear la vacunación como la medida sanitaria más eficaz en aquellos colectivos donde la frecuencia de complicaciones graves es mayor.

La posibilidad de desarrollar vacunas compuestas por polisacáridos capsulares se basó en una serie de trabajos llevados a cabo por Avery en los años 30, en los que se puso de manifiesto la existencia de una cápsula de naturaleza polisacáridica que cubría la superficie del neumococo (Avery, OT. y Goebel, WF., 1933). Estos trabajos culminaron con la elaboración de una vacuna antineumocócica que sería poco utilizada por el descubrimiento de un antibiótico, la penicilina, que presentaba una elevada eficacia terapéutica frente a este microorganismo dejando de ser consideradas las infecciones causadas por neumococo como un problema. E introduciéndose el tratamiento antibiótico de forma rutinaria en los años 1940, tras el descubrimiento de la extraordinaria sensibilidad a la penicilina. Sin embargo en la década de los 1960, en trabajos llevados a cabo por Austrian y colaboradores (Austrian, R. y Gold, J., 1964) observaron que la neumonía neumocócica causaba más muertes en Estados Unidos que ninguna otra enfermedad infecciosa, a pesar de la aparente eficacia terapéutica que la penicilina mostraba en los ensayos realizados en el laboratorio *in vitro*, sacando como conclusión el fracaso de la penicilina en la disminución de la prevalencia de la bacteriemia neumocócica. Como consecuencia de esa observación la obtención de una vacuna eficaz que pudiera prevenir las infecciones neumocócicas invasivas volvió a ser un objetivo prioritario.

2.7.1. Vacunas polisacáridicas.

En los años 70 se reanudaron los esfuerzos para el desarrollo de mejores vacunas polisacáridicas frente a neumococo (Smit, P. y cols., 1977), debido principalmente a la emergencia de cepas resistentes a antibióticos.

El comienzo del desarrollo de la vacuna fue difícil pues se sabía que la protección inducida por la cápsula era tipoespecífica y existían 90 polisacáridos capsulares diferentes (Henrichsen, J., 1995). Pero se comprobó que determinados serotipos de *S. pneumoniae* se encontraban asociados a infecciones neumocócicas invasoras con mayor frecuencia que otros, por lo que en la producción de la vacuna se utilizaron aquellos serotipos mas prevalentes. La primera vacuna de 14 polisacáridos (14-valente) se aprobó en USA en 1977. Las vacunas actuales 23-valente contienen polisacáridos capsulares purificados de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Esta vacuna presenta una cobertura del 83% y reduce el riesgo de infección sistémica en la población adulta (Hutchinson, BG. y cols., 1999). La eficacia de esta vacuna, sin embargo es aún debatida en algunos grupos de riesgo (Avanzini, MA. y cols., 1995; King, JO. y cols., 1996). Aproximadamente, un 20% de los mayores de 65 años parece responder frente a la mayoría de los 23 polisacáridos capsulares que contiene la vacuna (Rubins, JB. y cols., 1999). Se entiende que la respuesta de anticuerpos tras la vacunación en la población anciana es baja, aunque un estudio de vacunación polisacáridica que incluyó un gran número de pacientes, no mostró diferencias en cuanto a niveles de anticuerpos inducidos por la vacuna entre adultos y ancianos (Hutchinson, BG. y cols., 1999). En los ancianos la actividad de los anticuerpos parece baja probablemente por presentar una menor capacidad fagocítica y un incremento de base en la vulnerabilidad a la infección neumocócica (Romero-Steiner, S. y cols., 1999).

En el los niños menores de 2 años, la inmunogenicidad de las vacunas polisacáridicas es muy pobre (Pomat, WS. y cols., 1994; Stoeckle, MY. y cols., 1994) debido a la inmadurez de su sistema inmunitario y por tanto a la falta de respuesta frente a los polisacáridos capsulares a esas edades (antígenos T-independientes) (Rijkers, GT. y cols., 1996). Si bien los serotipos altamente inmunógenos, como el 3 pueden generar anticuerpos en lactantes de sólo 3 meses de edad (CDC. 1997).

La respuesta obtenida tras la vacunación entre los 2 y 5 años de edad es poco intensa y de corta duración. Y a partir de los 8 – 10 años la respuesta se equipara con la obtenida en el adulto. (Picazo, JJ., 2006).

También se observan respuestas inadecuadas en determinados grupos de personas con mayor riesgo de infecciones neumocócicas, como las infectadas por el VIH, los pacientes con neoplasias hematológicas y los receptores de trasplante de médula ósea. (Eskola, J. y cols., 2007).

2.7.2. Vacunas conjugadas.

Son aquellas obtenidas a partir de polisacáridos capsulares de diferentes serotipos de *S. pneumoniae*. Los polisacáridos son conjugados a proteínas entre las que se encuentran CRM 197 (mutante atóxico de la toxina diftérica), proteínas de membrana externa de meningococo B o toxoide del tétanos (Eskola, J. y Antilla, M., 1999). La conjugación del polisacárido a una proteína transportadora estimula los linfocitos B desde edades muy precoces, así como los linfocitos T, generando memoria inmunitaria e induciendo protección duradera incluso en los niños muy pequeños. Haciendo que estas vacunas conjugadas sean muy inmunogénicas en niños, sin embargo parece ser que estas vacunas en los adultos no mejoran la respuesta de los anticuerpos si la comparamos con la vacuna convencional 23-valente (Briles, DE. y cols, 2000). Estas vacunas presentan aún algunos aspectos que deberán ser analizados,

como los relacionados con su composición y con el número de serotipos que deberán incluirse en su composición.

El problema deriva de la falta de información de los serotipos predominantes en muchas partes del mundo (Hausdorff, WP. y cols., 2000) con los que poder diseñar vacunas efectivas para la población a nivel regional o mundial. En estudios realizados por Sniadack y colaboradores (Sniadack, DH. y cols., 1995) se comprobó que los serogrupos 14, 6 y 19 son los aislados a nivel mundial con mayor frecuencia en localizaciones normalmente estériles de niños infectados. En su estudio describen los serogrupos más comunes con los que sugirieron diseñar una vacuna 9-valente óptima para uso a nivel mundial. Aunque en el caso de que una vacuna conjugada multivalente contenga los 9 serotipos más virulentos sólo lograría cubrir del 80-90% de los serotipos neumocócicos aislados de los pacientes a nivel mundial (Hausdorff, WP. y cols., 2000). Se podría parar a pensar que esto conllevara a un aumento de la incidencia de serotipos no incluidos en la vacuna (Lipsitch, M. y cols., 2000).

Otras vacunas antineumocócicas que se están desarrollando para mejorar globalmente la eficacia de la vacuna heptavalente, es una vacuna de 10 serotipos que incluye un nuevo transportador: la proteína D (PD) de superficie de *H. influenzae* capsulados y no capsulados. (García-Sicilia López, J., 2007).

Hausdorff y colaboradores (Hausdorff, WP. y cols., 2005) en sus trabajos han confirmado que los serotipos incluidos en la vacuna heptavalente son los más prevalentes en niños de 6 meses a 2 años de edad y los que están más presentes en personas con VIH, en ancianos y en otros adultos con otras inmunodeficiencias; además esta contiene la mayoría de los serotipos resistentes a los antibióticos.

La vacuna conjugada es de mayor utilidad y eficacia en los niños pequeños en los que la vacuna actual de polisacáridos no les proporciona buena cobertura y además con ella se evitaría el reservorio principal de neumococos resistentes, que está constituido precisamente por este grupo etario. La única vacuna antineumocócica

conjugada autorizada en la actualidad y comercializada es Prevenar, que incluye los serogrupos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F y como proteína transportadora CRM 197. La vacuna contiene los 5 serotipos a los que se asocia el 80% de resistencia a antibióticos (Picazo, J.J., 2006). Es considerada una vacuna muy eficaz para evitar la enfermedad neumocócica invasora por los siete serotipos vacunales.

Para Fenoll (Fenoll, A. y cols., 2000) la cobertura de la vacuna heptavalente en España es de un 78% a un 81% de los serotipos dependiendo de su aislamiento. En relación a los serotipos causantes de enfermedad invasora los porcentajes de cobertura vacunal: en niños menores de 2 años responden al 80-85% para los serotipos que producen enfermedad invasora y otitis media, mientras que en los niños entre 2 y 5 años se sitúa entorno al 60% (Picazo, J.J., 2006).

Objetivos

El incremento de la resistencia en los patógenos respiratorios causantes de infecciones respiratorias en la comunidad, como su variabilidad geográfica y anual, empujan a la necesidad de realizar continuos estudios de sensibilidad. La distribución por áreas puede presentar diferencias significativas achacables a muchos factores, por este motivo dependiendo de cada región se deberían tener datos propios y actualizados periódicamente.

Además, el aumento de las cifras de aislados *S. pneumoniae* penicilino-resistentes a los antibióticos, sitúa a España en uno de los primeros países en presentar un nivel alto de resistencia frente a la penicilina.

Actualmente, el aumento de esta resistencia y los posibles cambios en la prevalencia de serotipos de *S. pneumoniae* suscita el interés de continuar realizando estudios epidemiológicos y poblacionales del mismo. No obstante, no existe una resistencia neumocócica plena a la penicilina ya que dosis altas pueden alcanzar parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos que no deberían producir fallos clínicos cuando se tratan neumonías, no meningitis. Este hecho viene demostrado por los datos clínicos que muestran eficacia con altas dosis de betalactámicos parenterales incluso con infecciones causadas por *S. pneumoniae* altamente resistentes a penicilina.

Por este motivo, tomando como referencia estos datos, el objetivo general de este proyecto es el de investigar aspectos relacionados con la resistencia en *S. pneumoniae*. Para ello pretendemos:

1.- Estudiar la sensibilidad de 977 aislados clínicos de distintos patógenos respiratorios (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*) de ocho

centros hospitalarios repartidos por toda la geografía española, frente a distintos antimicrobianos utilizados tradicionalmente en la terapia de infecciones respiratorias en la comunidad.

2.- Analizar mediante estudios de caracterización molecular (electroforesis en campo pulsado) la prevalencia de los distintos clones en aislados de *S. pneumoniae* con resistencia a amoxicilina en nuestro país.

3.- Determinar en un modelo *in vitro* de simulación farmacodinámica la actividad bactericida de la formulación amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg frente a la formulación convencional frente a cepas con diferente nivel de resistencia a amoxicilina.

Material y Métodos

1. Estudio de la sensibilidad:

1.1. Centros colaboradores

En el estudio se incluyeron ocho centros españoles, cuya distribución geográfica se muestra en la Figura 4. Estos centros se encontraban repartidos en las provincias de Barcelona, Zaragoza, Granada, Salamanca, Valencia, A Coruña, Sevilla y Madrid, situándose en esta última el laboratorio central donde se llevó a cabo todo el estudio y donde se procesaron los datos (Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid).

1.2. Aislados bacterianos

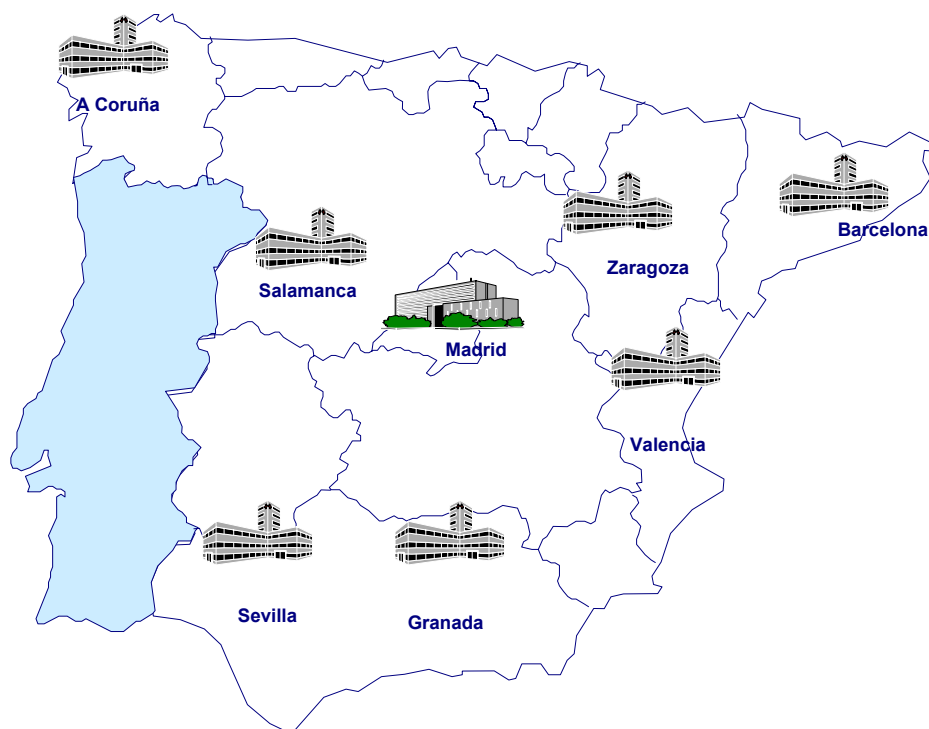
Con la participación de todos los centros, desde Agosto de 1998 a Noviembre del 2000, se obtuvo un total de **977** aislados de las siguientes especies en distintas proporciones:

- 299 aislados de *S. pneumoniae* (30-35%),
- 210 aislados de *H. influenzae* (30-35%),
- 361 aislados de *S. pyogenes* (20-25%) y
- 107 aislados de *M. catarrhalis* (10-15%).

Los aislados se obtuvieron de pacientes con infecciones del tracto respiratorio adquiridas en la comunidad, con enfermedades como la neumonía, bronquitis crónica, otitis media aguda, faringoamigdalitis o incluso exacerbación aguda de bronquitis crónica. Sólo se permitió incluir en el estudio aquellas muestras de cultivos obtenidos a partir de exudados faríngeos, esputos, lavado bronco alveolar y hemocultivos.

Estos aislados fueron parte de un estudio a nivel internacional, en el que participaron los siguientes países: Austria, Italia y España.

Figura 4. Distribución geográfica de los distintos centros colaboradores para el estudio de la resistencia en España.



1. Hospital Clínico (**Madrid**), Dept. de Microbiología. Prof. J. Prieto
2. Hospital Clínico (**Salamanca**), Dept. de Microbiología. Prof. J. A. García Rodríguez
3. Hospital Clínico (**Zaragoza**), Dept. de Microbiología. Prof. R. Gómez Lus
4. Hospital Virgen de las Nieves (**Granada**), Dept. de Microbiología. Prof. M. de la Rosa
5. Hospital La Fe (**Valencia**), Dept. de Microbiología. Prof. M. Gobernado
6. Hospital Residencia Príncipes de España (**Barcelona**), Dept. de Microbiología. Prof. R. Martín
7. Hospital Virgen de la Macarena (**Sevilla**), Dept. de Microbiología. Prof. F. Perea
8. Hospital Juan Canalejo (**A Coruña**), Dept. de Microbiología. Prof. A. Guerrero

1.3. Recogida y transporte al laboratorio central

Después de la identificación de cada especie bacteriana, usando métodos estándar para cada centro, los aislados fueron congelados a -70°C . El transporte de estas cepas al laboratorio central (en Madrid), fue mediante torundas mantenidas en medios Amies o en placas de agar con el medio requerido por cada microorganismo en diversos lotes. Los medios utilizados fueron los siguientes:

- Agar sangre: para *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*.
- Agar chocolate: para *H. influenzae* y *M. catarrhalis*.

Una vez recogidos en el laboratorio central, los aislados fueron cultivados en un medio apropiado para cada especie microbiana, y se congelaron diez muestras de cada una de ellas a -70°C en leche desnatada (Laboratorios Disco) para la posterior determinación de la sensibilidad.

1.4. Agentes antimicrobianos

Los antibióticos empleados en todas las determinaciones de sensibilidad fueron los siguientes:

- penicilina V (Sigma-Aldrich),
- amoxicilina (Sigma-Aldrich),
- amoxicilina-ácido clavulánico (Glaxo Smithkline),
- cefaclor (Sigma-Aldrich),
- cefixima (Merck),
- cefpodoxima-axetilo (Sankyo Pharma GmbH),
- cefuroxima (Sigma-Aldrich),
- ceftibuteno (Schering-Plough), y
- azitromicina (Pfizer).

Los diferentes puntos de corte (mg/l) utilizados para determinar la sensibilidad/resistencia fueron los definidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1992), hoy conocido como el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007).

Los puntos para *S. pneumoniae* se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Puntos de corte de *S. pneumoniae* frente a los distintos antibióticos utilizados en el estudio.

Agente Antimicrobiano	CMI (mg/l)		
	S	I	R
Penicilina	≤0,06	0,12-1	≥2
Amoxicilina	≤2	4	≥8
Amoxicilina/clav	≤2/1	4/2	≥8/4
Cefaclor	≤1	2	≥4
Cefixima	ND ¹	ND ¹	ND ¹
Cefpodoxima	≤0,5	1	≥2
Cefuroxima	≤1	2	≥4
Ceftibuteno	ND ¹	ND ¹	ND ¹
Azitromicina	≤0,5	1	≥2

S: sensible, I: intermedio, R: resistente

ND¹: puntos de corte no disponibles por el CLSI

Los puntos de corte para *S. pyogenes* y penicilina son: S: ≤0,12; I: 0,25-2 y R: ≥4. Todas las cepas sensibles a penicilina pueden ser sensibles a amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, cefpodoxima, cefuroxima, ceftibuteno y cefaclor. No existen puntos de corte establecidos por el CLSI para cefixima y *S. pyogenes*. El punto de corte para este microorganismo y azitromicina es: S: ≤0,5; I: 1; R: ≥2.

Los diferentes puntos de corte de *H. influenzae* se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Puntos de corte de *H. influenzae* frente a los distintos antibióticos utilizados en el estudio.

Agente Antimicrobiano	CMI (mg/l)		
	S	I	R
Penicilina	ND ¹	ND ¹	ND ¹
Amoxicilina	≤1 ²	2 ²	≥4 ²
Amoxicilina/clav	≤4/2	-	≥8/4
Cefaclor	≤8	16	≥32
Cefixima	≤1	-	-
Cefpodoxima	≤2	-	-
Cefuroxima	≤4	8	≥16
Ceftibuteno	≤2	-	-
Azitromicina	≤0,5	1	≥2

S: sensible, I: intermedio, R: resistente

ND¹: puntos de corte no disponibles por el CLSI

-²: Punto de corte para ampicilina.

No están disponibles los puntos de corte de *Moraxella catarrhalis* en el CLSI.

1.5. Estudio de sensibilidad

El término de concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de forma visible a las 20-24 horas de incubación a una temperatura de 35°C.

Las CMIs fueron determinadas utilizando la técnica de microdilución en caldo (CLSI, 2007), con un volumen final de 100 µl y un inóculo de aproximadamente 10⁵ ufc/ml. Los medios utilizados fueron los siguientes:

- caldo Mueller-Hinton (Laboratorios Difco, Detroit, Mich.) suplementado con cationes y un 2% de sangre de caballo lisada (Biomérieux) para *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*,
- medio Haemophilus Test Medium (HTM) para *H. influenzae*,
- caldo Mueller-Hinton para *M. catarrhalis*.

Este proceso fue realizado por triplicado.

Después de la incubación “overnight”, a 35 °C en ambiente aerobio durante 20-24 h., la lectura se determinó siguiendo las normas de la CLSI para microdilución, determinando la CMI final como la moda de los 3 resultados obtenidos.

Se utilizaron como cepas controles: *S. pneumoniae* ATCC 49619 para *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*; y *H. influenzae* ATCC 49247 para *H. influenzae* y *M. catarrhalis*. Estas cepas utilizadas en la determinación de la CMI van en función del antibiótico. Solamente fueron aceptadas las CMIs donde las determinaciones de sensibilidad control obtenidas están incluidas en el rango establecido por el CLSI.

Las concentraciones antimicrobianas ensayadas fueron elegidas utilizando como referencia el rango de sensibilidad de cada microorganismo. Estos puntos de

corte utilizados para calcular los porcentajes de resistencia estaban basados en los publicados en el CLSI.

1.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los porcentajes de resistencia (con *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*) y la producción de betalactamasas (con *H. influenzae*) en el periodo de los dos años de estudio, fue realizado mediante el test chi-cuadrado con la correlación de Yates cuando era necesario (el nivel de significancia fue = 95%). Estos test se llevaron a cabo con el software SPSS.9.5.

2. Caracterización molecular mediante electroforesis en campo pulsado de cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a amoxicilina.

La técnica de electroforesis en gel mediante campo pulsado, PFGE ("Pulsed Field Gel Electrophoresis"), constituye uno de los procedimientos de tipificación de microorganismos más empleados en la actualidad. Su utilidad radica en la detección de posibles brotes mediante la demostración de identidad clonal en cepas procedentes de uno o varios orígenes.

Esta técnica consiste en el tratamiento del genoma con enzimas de restricción (específicos para el microorganismo a estudiar) que presentan una baja frecuencia de corte (10-30 fragmentos). De este modo se obtiene un patrón de bandas no excesivamente simple, que daría lugar a una baja discriminación no demasiado compleja que hiciera inabordable su interpretación.

Este proceso se lleva a cabo en el interior de un molde de agarosa que facilita la protección del material genético bacteriano de las degradaciones inespecíficas producidas por fuerzas mecánicas. En la electroforesis se utiliza un aparato con la capacidad de cambiar la polaridad y la frecuencia de los pulsos del campo eléctrico que genera. De esta manera, con el aumento de los tiempos de aplicación de dicho campo eléctrico se consigue obtener una buena resolución en la separación, tanto de fragmentos de elevado peso molecular como de fragmentos de pequeño tamaño.

2.1. Aislados bacterianos

Se seleccionaron 51 cepas de *S. pneumoniae* con sensibilidad disminuida frente a amoxicilina en España, con el fin de poder comparar lo mejor posible las características de los aislados resistentes a amoxicilina en términos de perfil de resistencia antimicrobiana, tipo clonal y serotipo.

2.2. Experimento

Se trató el ADN total de los aislados con la enzima de restricción para obtener fragmentos de ADN, y posteriormente fueron separados por electroforesis de campo pulsado utilizando el método de Soares y cols (Soares, S., 1993) con algunas modificaciones.

Este protocolo se utilizó para todos los aislados y consistió en los siguientes pasos:

1. *Preparación de los bloques de agarosa que contienen en su interior el ADN bacteriano.*

Se inoculó 60 µl de la cepa descongelada en medio agar sangre y se realizó una incubación “overnight”, a 35 °C en ambiente con 5 % CO₂ durante 20-24 h. A partir del crecimiento de *S. pneumoniae* se tomaron dos colonias, se incluyeron en 10 ml de caldo BHI (Disco, SA) y se hizo una incubación “overnight” al baño maría sin agitación, a 37°C. Tras aproximadamente unas 6 horas de incubación se alcanzó la fase logarítmica en la que se obtiene una densidad óptica 0,7-0,9 a 620 nm, medida en el espectrofotómetro Spectronic 21 (Bausch&Lomb).

A continuación se centrifugó durante 10 minutos a una velocidad de 1500 rpm a 4°C (GS-GR Centrifuge, Beckman). Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1ml de TN buffer (Tabla 4). Después se pasó a un tubo eppendorf y se centrifugó durante 10 minutos a una velocidad media de 2000 rpm (Centrifuge 5415C, Eppendorf), con el fin de sedimentar las células.

Se volvió a desechar el sobrenadante y se resuspendió en 200 μ l de solución TN buffer (volumen total aproximado de 240 μ l). Para ajustar la concentración se cogió 5 μ l de la mezcla, se incorporaron en 1 ml de TN buffer.

A partir de la concentración bacteriana ajustada se pipetearon 150 μ l y se pasaron a un tubo eppendorf, en el que se añadieron otros 150 μ l de agarosa LMP (low melting point) (Sea Plaque, FMC Products) al 2% en tampón fosfato, y se mantuvo la mezcla en el termorregulador a una temperatura entre 50-55 °C para evitar su solidificación. Se mezclaron por agitación en el vórtex (Schott Ibérica) y se distribuyó en unos moldes específicos para la formación de bloques. Se dejaron solidificar a temperatura ambiente o a -20°C durante unos 5 minutos.

Después de su solidificación se pasaron los bloques a otros eppendorfs con 1 ml de solución EC-lisis (Tabla 4) y se incubaron durante 3 horas a 37°C en agitación suave con el fin de activar la lisis por la acción de los detergentes y destruir el ARN por la ARNasa que poseen. Pasado este tiempo se desechó la solución anterior y se incubaron los bloques en 1 ml de solución ESP (ES (Tabla 4) + Proteinasa (1mg/ml)) durante 17 horas a una temperatura de 56°C con agitación. Esta solución contiene proteinasa K procedente del hongo *Tritirachium album* (Boehringer Mannheim) cuya función es eliminar las proteínas.

Posteriormente se realizaron una serie de lavados de los bloques, para ello se reemplazó la solución anterior por 1 ml de solución TE (Tabla 4) durante 1 hora a una temperatura de 56°C con agitación suave, después se reemplazó el TE por otro nuevo a temperatura ambiente. Este último lavado se repitió de 2 a 3 veces. Estos bloques ya pueden ser utilizados en el siguiente paso.

Tabla 4. Reactivos empleados en la elaboración de la electroforesis en campo pulsado.

TN buffer	1M TrisCl pH 7,6 (10 mM) 5M NaCl (1M) H ₂ O
EC Lysis	1M Tris pH 8 (5 ml) NaCl 29,2 g 0,5 EDTA pH 8 (100 ml) Deoxicolato sódico 1 g Laurel sarcosina 2,5 g Brj 58 2,5 g H ₂ O
ES	93,1 g EDTA pH 9 sarcosyl 0,5 g H ₂ O
TE	1M Tris pH 7,5 0,5M EDTA pH 8 H ₂ O

2. Restricción de los bloques.

Se cortó un tercio del bloque y se llevó a un tubo eppendorf con 80 μ l del tampón de restricción y se incubó a 25°C (temperatura de restricción) durante 15-30 min. El resto del bloque se guardó para posteriores electroforesis en TE a -4°C hasta su utilización. A continuación se eliminó el tampón de restricción y se añadieron 45 μ l de la solución de restricción que contiene 10 Unidades de la enzima *Sma*I (New England Biolabs) durante 2-3 horas a 25°C. Después se quita el tampón y la enzima y se reemplaza por 0,5 ml de la solución de TE mientras se prepara el gel de agarosa para la electroforesis.

3. Electroforesis de campo pulsado (PFGE)

En la realización de la electroforesis los bloques fueron introducidos en los pocillos previamente creados con un peine en un gel de agarosa 1,2% (Seakem LE, FMC Products) en tampón 0,5 x TBE (Biorad Laboratories). También se utilizaron bloques de marcadores moleculares (Lambda ladder, New England Biolabs). La electroforesis de campo pulsado se llevó a cabo en aparatos CHEF-DRII y DR-III (Biorad Laboratories) donde el gel se sumergió en el tampón 0,5 x TBE.

El tanque se llenó con 2 L de la solución TBE 0,5% (Tabla 4) y se dejó enfriar a 11.3°C antes de comenzar la electroforesis.

Las características de la electroforesis fueron las siguientes:

- Temperatura: 11,3°C
- Tiempo: 23 horas
- Pulso inicial: 5 segundos

- Potencia: 6 V/cm
- Velocidad de recirculación del tampón: 70

4. Tinción y fotografiado.

El ADN se visualizó en los geles mediante una tinción con bromuro de etidio (0.4-1.0 µg/ml), sumergiendo cada uno de los geles en 250 ml de agua bidestilada con 15 µl de bromuro de etidio durante 15 minutos, y posteriormente se observaron bajo luz UV. Los diferentes patrones obtenidos por PFGE fueron asignados por inspección visual de los perfiles de macro-restricción utilizando los criterios aceptados (Tenover, FC., 1995).

Para el análisis de los patrones de restricción siguiendo los criterios aceptados de Tenover se sigue las siguientes premisas: dos aislados son genéticamente indistinguibles cuando los patrones de restricción tienen el mismo número de bandas y estas tienen el mismo tamaño, están relacionados cuando difieren en el patrón por un único evento genético lo que resulta en diferencias en 2 ó 3 bandas, están posiblemente relacionados cuando difieren en dos eventos genéticos independientes lo que corresponde a diferencias en 4 a 6 bandas, y no están relacionados cuando los patrones difieren en 3 o más eventos genéticos independientes que se traducen en diferencias en 7 o más bandas.

3. Simulaciones farmacodinámicas (Cobertura por simulación por SR.)

3.1. Aislados bacterianos.

Se seleccionaron diez cepas de *S. pneumoniae* con diferentes sensibilidades a amoxicilina:

- cuatro de ellas con una CMI de 4 mg/l frente a amoxicilina (dos del serotipo 9, una del serotipo 23 y otra del serotipo 14),
- cinco con CMI de 8 mg/l (una del serotipo 6, dos del serotipo 14, otra del serotipo 23 y otra más del serotipo 9)
- y una cepa con CMI de 16 mg/l frente a amoxicilina (del serotipo 6) fueron estudiadas en este modelo farmacodinámico *in vitro*.

Todas estas cepas fueron aisladas de infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad.

3.2. Agente antimicrobiano

Los antibióticos utilizados fueron amoxicilina trihidratada y ácido clavulánico de potencia conocida, que fueron facilitados por los laboratorios GlaxoSmithKline (Worthing, Inglaterra, Reino Unido y Tres Cantos, España respectivamente).

3.3. Estudio de sensibilidad

La sensibilidad antimicrobiana de amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico se realizó mediante la determinación de las CMIs y las concentraciones mínimas bactericidas (CMBs) utilizando el método de microdilución en caldo según la metodología recomendada por el CLSI. Se utilizó caldo Mueller-Hinton (Laboratorios

Difco, Detroit, Mich) suplementado con cationes de calcio y magnesio y un 5% de sangre de caballo lisada (Biomérieux). Además, las CMI's también fueron realizadas en caldo Todd Hewitt (laboratorios Difco, Detroit, Mich) suplementado con 0,5% de extracto de levadura (laboratorios Difco, Detroit, Mich). Las distintas determinaciones de sensibilidad se realizaron antes y después del proceso de la simulación. El rango de dilución utilizado fue de 1 mg/l y se incubó a 35°C durante 24 h. Todas las determinaciones fueron repetidas cinco veces, considerándose los valores modales.

Posteriormente se determinaron las CMB, que se definen como la concentración correspondiente a la mayor dilución de antibiótico que inhibe el crecimiento del 99,9% de los microorganismos. Este proceso se realiza a partir de las diluciones utilizadas en la determinación de la CMI, en el que se toman 10 µl de la dilución correspondiente a la CMI, además de 2 ó 3 diluciones superiores consecutivas, se procede a su siembra en placas agar sangre (Laboratorios Difco, Detroit, Mich.), y se incubaron a 35°C con 5% de CO₂ durante 20-24 h.

3.4. Sistema cinético *in vitro*

Para la elaboración de este estudio se empleó una modificación del sistema bicompartimental cerrado originalmente ideado por Blaser y colaboradores (Blaser, J. y cols., 1985; Blaser, J. y cols., 1987), todo ello debidamente computerizado, tal y como describieron Boubakar y cols. posteriormente (Boubakar, BB. y cols., 2001). Este sistema fue diseñado con el fin de exponer a las bacterias a diferentes cambios de concentraciones antibióticas, evitando la dilución del inóculo bacteriano, consiguiendo al mismo tiempo una cinética de primer orden mientras se va eliminando progresivamente el antimicrobiano.

El modelo que hemos realizado ha sido el diseñado por el equipo de nuestro Departamento de Microbiología I (Sevillano, D. y cols., 2004), el mismo consta de los siguientes compartimentos (Figura 5):

- **Reservorio**, consiste en un depósito con medio fresco, que se encuentra incluido en un baño (HB 4 básico, IKA, Staufen, Alemania) que mantiene una temperatura constante de 37 °C.
- **Bombas peristálticas** automatizadas (Maxterflex, Cole-Parmer Instrument Company, Chicago Ill.), que se encargan de la difusión del medio de cultivo desde el reservorio hacia el compartimento central para la dilución antibiótica, con una velocidad previamente programada, y su posterior difusión hacia los compartimentos periféricos.
- Un **compartimiento central** estéril formado por un frasco de 500 ml (Belco Glass) conectado a unas tuberías de entrada y salida, que corresponden a una serie de unidades capilares que representan la circulación sistémica del organismo humano, todo ello se encuentra controlado por un sensor de temperatura.
- Una **bomba de dosificación** (402 Dilutor Dispenser; Gilson S.A, Villiers-le-Bel, Francia). Esta bomba se encuentra controlada por ordenador, con lo que permite simular las concentraciones en suero después de la administración del antibiótico directamente en el compartimiento central hasta que se alcanza la Cmax. El antibiótico se introduce a una velocidad de 6 ml/min al compartimiento central, circula hasta el compartimento periférico donde pasa a través de las

paredes de los capilares de los cartuchos, y allí el antibiótico interactúa con las bacterias, por difusión unidireccional de la presión.

- Un **compartimiento periférico** que representa el área de la infección bacteriana. Este compartimiento está formado por cartuchos de fibra hueca con un tamaño de poro de 0,2 μm y de 550 cm^2 de superficie de filtración (FiberFlo, Minntech Corporation, Minneapolis, MN, USA). Los cartuchos están compuestos por microcapilares que permiten la difusión bidireccional de los antibióticos y el medio de cultivo del compartimiento central al periférico, y a su vez evitan la penetración bacteriana al compartimiento central. Todo este compartimiento periférico se encuentra dentro de una estufa donde se mantiene una temperatura de 37°C.
- Las **bombas adicionales**, que se encargan de recircular la mezcla/combinación del medio de cultivo y el antibiótico en el interior del cartucho con una velocidad constante de 25 ml/min.
- Compartimento de **eliminación**. Último compartimento donde se recoge el volumen residual de toda la simulación. La velocidad de entrada y salida del medio dentro del sistema es la misma con el fin de mantener siempre el volumen del sistema en todo momento constante (400 ml), permitiendo simular la vida media del antibiótico ($t_{1/2}$).

Todo el sistema se mantuvo a una temperatura de 37°C.

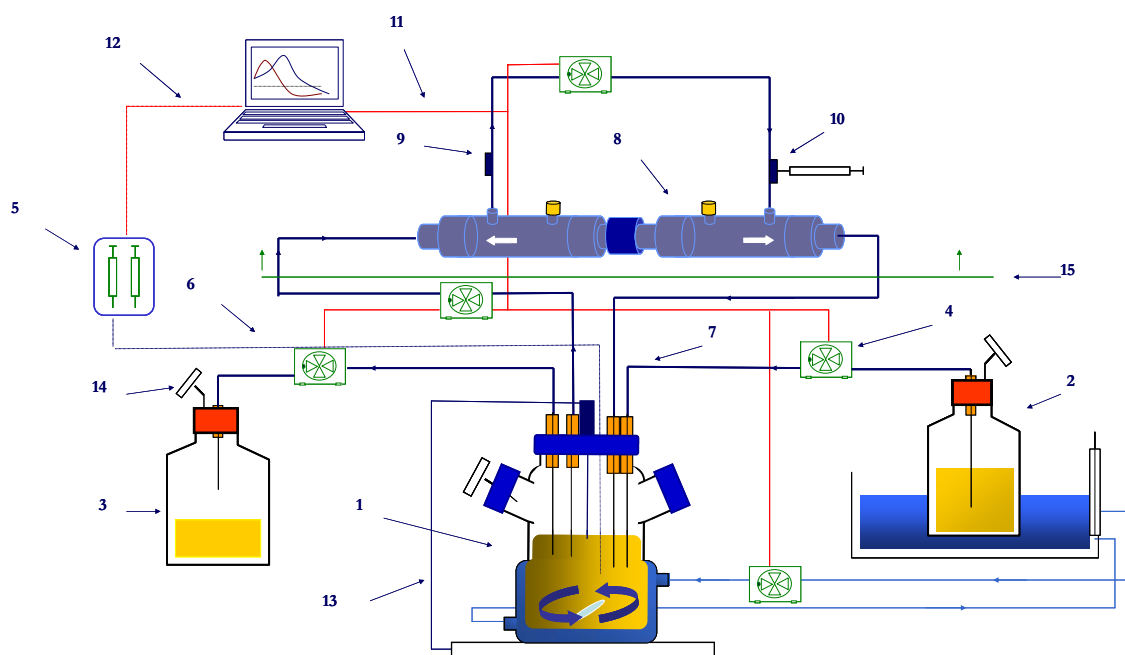


Figura 5: 1. Compartimento central (Frasco Bellco de doble camisa), 2. Reservorio con caldo fresco, 3. Eliminación, 4. Bombas peristálticas, 5. Bomba de inyección, 6. Tubería PTFE, 7. Tubería de silicona, 8. Compartimento periférico (capsulas de fibra hueca), 9. Puerto de inoculación, 10. Puerto de muestreo, 11. Red RS-232, 12. Red GSIOC, 13. Sonda de temperatura conectada a baño termostatzado, 14. Filtros de aire y 15. Incubador.

3.5. Simulaciones farmacocinéticas

Según el modelo descrito anteriormente se simularon los perfiles farmacocinéticos buscados en otros estudios (Tabla 5) posiblemente alcanzados en el organismo humano de las siguientes formulaciones:

- Formulación de liberación sostenida de amoxicilina 2000 mg (amoxicilina SR), de administración cada 12 horas (pico sérico de 16,5 mg/l) y;

- amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg, cuya administración es cada 8 horas (pico sérico de 11,7 mg/l).

Ambos antibióticos se disolvieron en volúmenes totales de 4,620 y 4,516 ml de tampón fosfato (pH 6) para conseguir concentraciones de 5120 y 10240 mg/l para amoxicilina y amoxicilina/clavulánico respectivamente, e inmediatamente se procedió a su administración mediante la bomba de dosificación, que nos permite incluir la fase de absorción determinada a ambas formulaciones. Por lo tanto se ajustó la velocidad de aclaración de la bomba de dosificación, y obtuvimos los diferentes picos máximos en un tiempo de 1,5 h.

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos de amoxicilina y ácido clavulánico después de administrar una dosis oral única de amoxicilina/ácido clavulánico en voluntarios sanos (n=55) (Kaye, CM., 2001).

Parámetro	Amoxicilina	Clavulánico
ABC_{0-∞} (mg.h/l)	71,6 ± 16,5	16,095 ± 0,3
C_{max} (mg/l)	17,0 ± 4,0	2,05 ± 0,80
T_{max} (h)	1,5 ± (1,0-6,00)	1,03 ± (0,75-3,00)
T>CMI para CMI=4 mg/l (h)	5,93 ± 1,20	ND
T>CMI (% intervalo posológico 12 h)	49,4 ± 10,2	ND
t_{1/2} (h)	1,27 ± 0,20	1,03 ± 0,17

ND: No determinado

Se programaron las velocidades de las bombas peristálticas del sistema de tal manera que simulasen la media de las $t_{1/2}$ de amoxicilina y ácido clavulánico (1,1h), para obtener un aclaramiento de 1,38 ml/min en la primera fase (0-5h) de la simulación de amoxicilina 2000 mg y una aclaramiento de 4,2 ml/min para amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg y para la fase de la eliminación (5-12h). Estas velocidades en las bombas peristálticas fueron sincronizadas sobre 24h usando el software Win Lin (Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, USA).

Para los controles de crecimiento se ajustó la velocidad de aclaramiento como la media de los dos aclaramientos diferentes que se utilizan en el estudio (2,8 ml/min fueron realizados con el mismo volumen de caldo, 400 ml). Todo el sistema se mantuvo a una temperatura de 37 °C durante las 24 h de duración de cada simulación farmacodinámica.

3.6. Experimento

En la realización de cada experimento, se cogieron 1 ó 2 colonias de *S. pneumoniae* de un pase fresco del agar de Mueller-Hinton suplementado con cationes y un 5% de sangre lisada de oveja realizado 24 horas antes, y se incorporaron en 20 ml de caldo de Todd-Hewitt suplementado con 0,5% de extracto de levadura. Obteniéndose una suspensión con un crecimiento de concentración final de 10^6 ufc/ml, según lo medido por un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Hitachi U-1100). De este inóculo inicial se cogió una alícuota de 15 ml y se introdujeron en el compartimiento periférico correspondiente del modelo *in vitro* de la simulación una hora antes de cada proceso de la simulación para facilitar la adaptabilidad del microorganismo al medio de cultivo. Todos los inóculos iniciales estaban en torno a los $2,5 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^7$ ufc/ml.

Se recogieron diferentes muestras (0,5 ml) del compartimiento periférico a diferentes tiempos: 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 h. Con cada muestra recogida se realizaron diluciones seriadas (1:10) en solución salina al 0,9 %, posteriormente se plaquearon en agar Mueller-Hinton suplementado al 5% con sangre de oveja, y se incubaron durante 24 h en 5% CO₂ a 37°C, para su posterior conteo bacteriano. El límite de detección fue 10², y cada experimento fue realizado por triplicado.

3.7. Análisis farmacocinético

Para el análisis farmacocinético se realizaron simulaciones para amoxicilina y ácido clavulánico sin bacterias bajo las mismas condiciones que las realizadas con bacterias, tras la administración de amoxicilina 2000 mg de liberación sostenida y amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg. Estas simulaciones se realizaron por triplicado. Las concentraciones antibióticas experimentales se determinaron para confirmar las concentraciones simuladas deseadas.

Con este fin, se tomaron muestras de 0,5 ml del compartimiento periférico a los tiempos 0, 0,5, 1,5, 3, 4, 6, 8, 11 y 12h para la formulación incrementada de amoxicilina y a las 0, 0,5, 1,5, 3, 4, 5 y 8h para amoxicilina 875 mg, y a los tiempos de 0, 0,5, 1,5, 2, 3, 4 y 6h para el ácido clavulánico 125 mg. Todas las concentraciones se determinaron mediante ensayos microbiológicos (**bioensayos**).

La técnica del bioensayo se basa en comparar la respuesta de un microorganismo indicador muy sensible frente a diferentes concentraciones conocidas de un antimicrobiano.

Estos ensayos microbiológicos se realizaron por el método de difusión, debido a que es más exacto y reproducible que el método por dilución, donde la respuesta se mide como la zona de inhibición y por lo tanto como una progresión de la actividad

antimicrobiana en agar. Se construye una curva representando los diámetros de la zona de inhibición producidos por estándares con concentraciones variables del antimicrobiano. El diámetro de la zona de inhibición producido por una muestra desconocida se interpola en la curva anterior con la finalidad de así obtener la concentración (mg/l).

En nuestro estudio se utilizaron como microorganismos indicadores (Andrews, JM.y White, LO., 1999):

- *Micrococcus lutea* ATCC 9341, para los ensayos con amoxicilina y
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 productora de betalactamasas, para los ensayos con ácido clavulánico.

Primeramente se prepararon una serie de placas Petri de 15 cm de diámetro con agar Muller-Hinton (50 ml por placa) junto con concentraciones de *M. lutea* de 0,2 de absorbancia medido a una λ de 630nm y otra serie de placas sólo con agar Muller-Hinton. Tras su solidificación, en las placas Petri con sólo Muller-Hinton se realizó un cultivo en césped uniforme de concentraciones de *K. pneumoniae* de 0,04 de absorbancia medido a una λ de 640nm. A continuación se realizaron una serie de pocillos en el agar sembrado, para inocular las distintas muestras de 0,150 ml tomadas a los diferentes tiempos, y luego se incubaron todas las placas durante 18 a 24h a 37°C.

Posteriormente se midió la zona de inhibición de los pocillos de todas las placas inoculadas con un calibrador electrónico (Sylvac Ultra-Cal II, Fowler Scientific). Todas estas pruebas fueron realizadas por triplicado.

Las curvas patrón fueron construidas mediante la representación en gráficas enfrentando el diámetro de la zona de inhibición y el logaritmo de las concentraciones de antimicrobiano. Se realizó un análisis de regresión utilizando el programa de

estadística SPSS 9.0 para obtener la recta que mejor se ajustase. Se calculó la media de las tres medidas de los diámetros de las zonas de inhibición de cada muestra y se utilizó para obtener los resultados de la concentración de antimicrobiano extrapolando en la curva patrón. Las concentraciones de estos fármacos fueron analizadas con el programa profesional de WinNonlin (Pharsight, Mountainview, CA, USA).

La **C_{max}** y el **T_{max}** fueron obtenidos directamente con la observación de los datos; la constante de eliminación (**K_e**) se calculó como la pendiente obtenida por regresión lineal utilizando las últimas medidas en la fase terminal de la curva (por lo menos 3 pares de medidas de la curva tiempo-concentración). El área bajo la curva concentración-tiempo desde el tiempo 0 a la última concentración (**C_{final}**) medida (**ABC_{final}**) fue calculada por la regla trapezoidal. El área bajo la curva concentración-tiempo (**ABC**) fue calculada como:

$$ABC = ABC_{final} + C_{final}/K_e$$

El tiempo de las concentraciones que excedieron el valor de la CMI (**T>CMI**) fue calculado gráficamente a partir de los puntos semilogarítmicos de los datos concentración-tiempo.

3.8. Análisis estadístico

Se calculó la media de las ufc/ml de los tres valores obtenidos en el conteo de los aislados en cada tiempo durante las 24h de la simulación. Se determinó la reducción porcentual del inóculo inicial (RII) en diferentes tiempos utilizando la fórmula siguiente:

$$\% RII = 100 - (100 \times I_t)/I_o$$

donde: **It** es el número de ufc/ml en los distintos tiempos,

Io es el número de ufc/ml en el tiempo cero (inóculo inicial).

El inóculo inicial fue establecido en un 100%, por lo tanto RII en tiempo 0 es el 0%. Los diferentes % de RII entre en los diferentes tiempos fueron determinadas por el test de U. Mann-Mann-Whitney, donde pvalor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

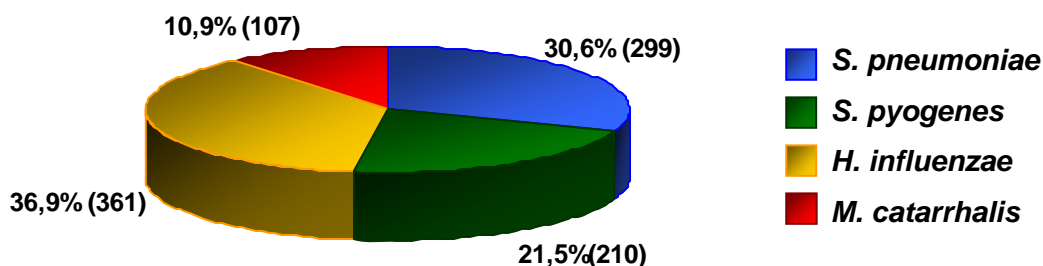
Resultados

1. Determinación de la sensibilidad de nueve antimicrobianos frente a patógenos respiratorios.

Número de aislados y distribución geográfica

Se recogió un total de 977 aislados en este estudio procedentes de distintos centros hospitalarios de España. La figura 6 recoge los porcentajes y número de aislados de cada tipo de microorganismo (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*).

Figura 6. Porcentaje y número de aislados totales recogidos en el estudio.



El propósito fue obtener un número representativo de aislados procedentes de diferentes regiones de España. La tabla 6 muestra la distribución geográfica del número de aislados por centro). El número más elevado de aislados fue recogido por A Coruña y Sevilla, y el más bajo fue en Granada, con solamente 107 cepas. El objetivo del estudio fue recoger aproximadamente 125 cepas por centro. Un 37,4% de las cepas fueron aisladas durante el año 2000, un 55,4% en 1999 y solamente un 7,2% en 1998 o años anteriores.

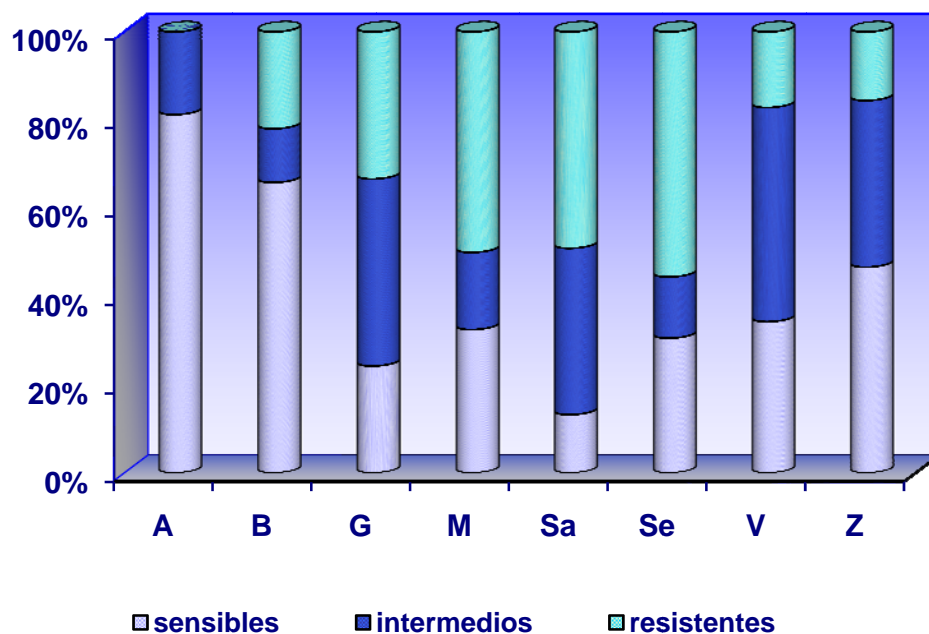
Tabla 6. Distribución de los aislados en los diferentes hospitales participantes en el estudio.

Provincia	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>M. catarrhalis</i>	Total
La Coruña	16	63	46	4	129
Barcelona	41	-	60	20	121
Granada	33	22	43	9	107
Madrid	40	15	32	32	119
Salamanca	53	12	58	2	125
Sevilla	36	45	47	-	128
Valencia	35	29	30	30	124
Zaragoza	45	24	45	10	124
Total	299	210	361	107	977

Streptococcus pneumoniae

Los porcentajes de resistencia que presenta *S. pneumoniae* son variables entre las diferentes regiones geográficas estudiadas de nuestro país. La distribución de los aislamientos de *S. pneumoniae* con los que participó cada centro hospitalario se muestra en la figura 7, atendiendo a la distinta sensibilidad que presentaban a la penicilina.

Figura 7. Distribución poblacional de la resistencia de *S. pneumoniae* a la penicilina en función de su origen geográfico.



A: La Coruña; **B:** Barcelona; **G:** Granada, **M:** Madrid; **Sa:** Salamanca; **Se:** Sevilla, **V:** Valencia; **Z:** Zaragoza

Las regiones con mayor porcentaje de resistencia a penicilina fueron Sevilla (n=20), con un valor del 55,5%, Madrid (n=20) con un 50% y Salamanca con un 49,05%. Estas resistencias fueron mucho más elevadas que las encontradas en el resto de los centros que participaron en el estudio: Granada (n=11) mostró un porcentaje de resistencia del 33,3%, Barcelona (n=9) un 21,9%, Valencia (n=6) un 17,1% y Zaragoza (n=7) solamente un 15,5%.

La Coruña (n=0) no presentó ningún aislamiento totalmente resistente a la penicilina ($\text{CMI} \geq 2\text{mg/l}$), y fue la ciudad que mayor porcentaje de aislamientos sensibles presentó, con un valor del 81,2%; Salamanca tuvo el menor porcentaje de

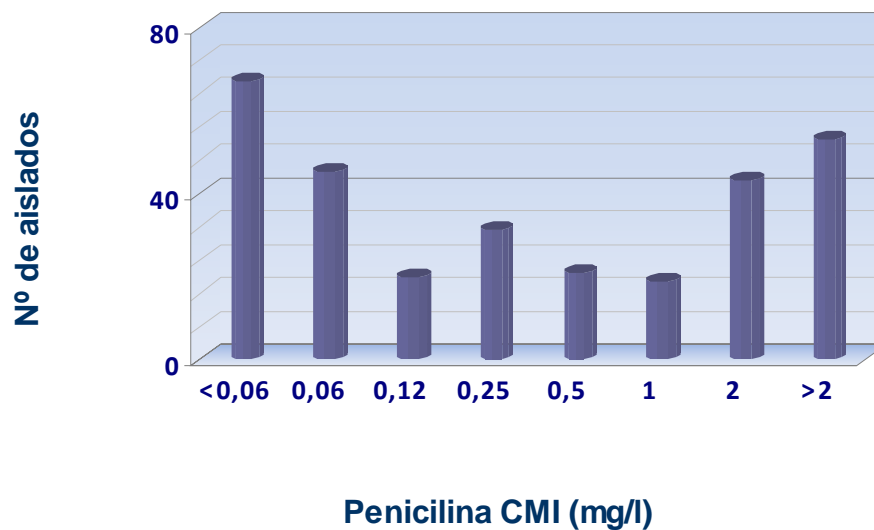
aislamientos sensibles (13,2%). El número de aislados de neumococos con diferente sensibilidad según las provincias se muestra en el tabla 7.

Tabla 7. Distribución de los aislados en base a su sensibilidad a penicilina en las diferentes provincias participantes en el estudio.

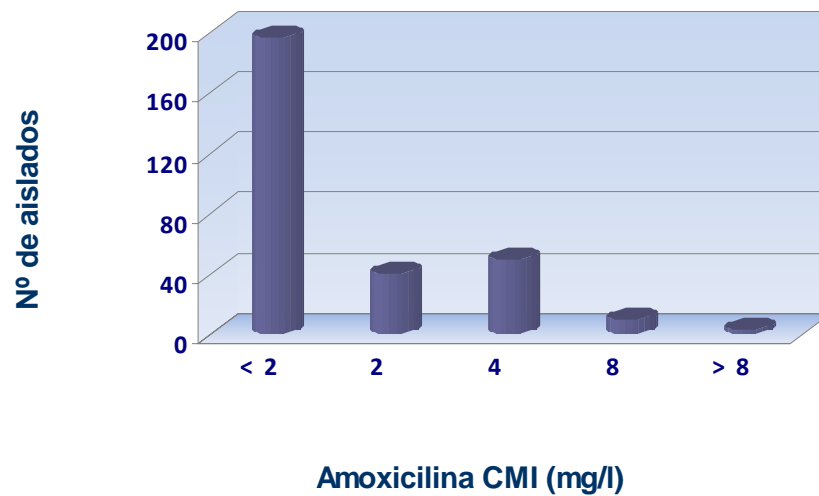
Provincia	Sensibles	Intermedios	Resistentes
La Coruña	0	3	13
Barcelona	9	5	27
Granada	8	14	11
Madrid	13	7	20
Salamanca	7	20	26
Sevilla	11	5	20
Valencia	12	17	6
Zaragoza	21	17	7
Total	81	88	130

Los aislados de *S. pneumoniae* fueron clasificados de acuerdo a las CMI que presentaban a penicilina. La distribución de los valores de CMI a penicilina se ilustra en la figura 8, donde todos los valores fueron representados dentro del intervalo de dilución de < 0,06 y > 2 mg/l. Del total de cepas aisladas, 112 cepas son sensibles a penicilina, 91 cepas muestran resistencia intermedia y 96 cepas presentaron alto nivel de resistencia a penicilina.

Figura 8. Sensibilidad a penicilina de 299 aislados de *S. pneumoniae*

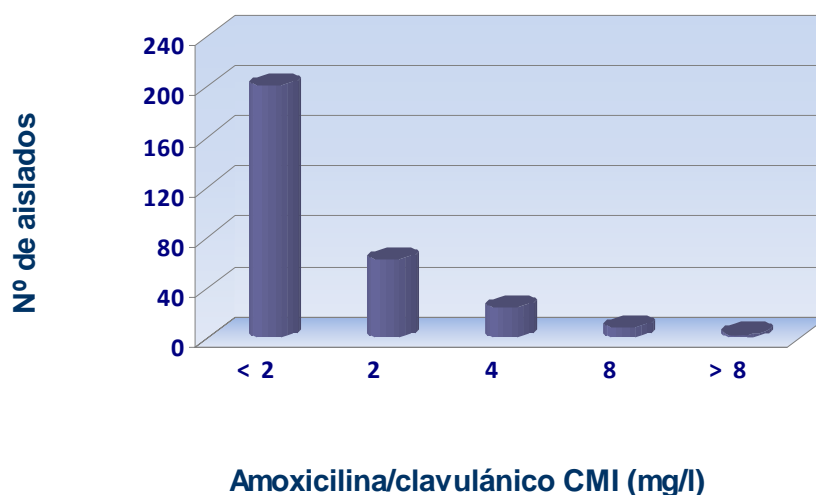


Estos aislados de *S. pneumoniae* también fueron clasificados de acuerdo a los datos de CMIs que presentaban a amoxicilina. La distribución de estos valores de CMI a amoxicilina se muestran en la figura 9, donde todos los valores fueron representados dentro del intervalo de dilución de <2 y > 8 mg/l, que son los puntos de corte para amoxicilina según el CLSI. Del total de los neumococos aislados (299), 237 cepas son sensibles a la amoxicilina, 49 cepas muestran resistencia intermedia y 13 cepas presentaron alto nivel de resistencia a amoxicilina.

Figura 9. Sensibilidad a amoxicilina de 299 aislados de *S. pneumoniae*.

La distribución de aislados de *S. pneumoniae* de acuerdo a los valores de CMIs a amoxicilina/clavulánico se muestran en la figura 10. Todos los valores fueron representados dentro del intervalo de dilución de <2 y > 8 mg/l, que son los puntos de corte para amoxicilina/clavulánico según el CLSI. Del total de los neumococos aislados (299), 263 cepas eran sensibles a la amoxicilina/clavulánico, 25 cepas muestran resistencia intermedia y 11 cepas presentaron alto nivel de resistencia a amoxicilina.

Figura 10. Sensibilidad a amoxicilina/clavulánico de 299 aislados de *S. pneumoniae*.



La sensibilidad a este microorganismo frente a los distintos agentes antimicrobianos ensayados se muestran en la tabla 8; donde los aislados fueron agrupados de acuerdo a su sensibilidad frente a la penicilina, tomando como rango el punto de corte de la CLSI (<0,06 y >2 mg/l). Los porcentajes de sensibilidad totales a penicilina fueron los siguientes: 37,5% para los aislados sensibles, 30,4% para las cepas con sensibilidad intermedia y 32,1% de cepas resistentes. Según los datos recogidos, en 1999 (n=166) la sensibilidad a penicilina que presentaron fue la siguiente: 39,2% sensible, 24,7% intermedio y 36,1% resistente.

En el año 2000 (n=110), estos porcentajes fueron de 34,5% sensible, 33,6% intermedio y 31,8% resistente. Entre los porcentajes de sensibilidad entre los años 1999 y 2000 no se apreciaron diferencias significativas.

Tabla 8. Actividad *in vitro* de varios agentes antimicrobianos frente *S. pneumoniae* (CMI₉₀, rango y % de cepas resistentes). Los aislados han sido distribuidos según la distinta sensibilidad a penicilina.

Agente antimicrobiano	Penicilina-sensible n=112 (37,46%)			Penicilina-intermedio n=91 (30,43%)			Penicilina-resistente n=96 (32,11%)			Cepas totales (n = 299)		
	CMI ₉₀	Rango	% R	CMI ₉₀	Rango	% R	CMI ₉₀	Rango	% R	CMI ₉₀	Rango	% R
Penicilina	0,06	0,007 - 0,06	-	1	0,125 - 1	-	>8	2 - >8	-	4	0,007 - >8	32,1
Amoxicilina	0,25	0,007 - 1	0,0	1	0,03 - 4	0,0	8	0,5 - >8	13,5	4	0,007 - >8	4,3
Amoxicilina/clav	0,25	0,007 - 1	0,0	1	0,03 - 4	0,0	8	0,5 - >8	11,4	4	0,007 - >8	3,6
Cefaclor	8	0,25 - 32	33,0	64	0,06 - >128	84,6	>128	2 - >128	98,9	128	0,06 - >128	69,9
Cefixima	2	0,03 - 4	ND ^a	8	0,06 - >8	ND ^a	>8	0,25 - >8	ND ^a	>8	0,03 - >8	ND ^a
Cefpodoxima	0,125	0,015 - 1	0,00	2	0,03 - >8	17,5	8	0,06 - >8	84,3	4	0,015 - >8	32,4
Cefuroxima	0,25	0,007 - 8	0,9	4	0,03 - 8	18,6	8	0,5 - >8	87,5	8	0,007 - >8	34,1
Ceftibuteno	4	0,06 - >8	ND ^a	8	0,06 - >8	ND ^a	>8	0,25 - >8	ND ^a	8	0,06 - >8	ND ^a
Azitromicina	0,25	<0,015 - >8	5,3	8	<0,015 - >8	15,3	>8	<0,015 - >8	55,2	>8	<0,015 - >8	24,4

^a ND, puntos de corte no disponibles por el CLSI.

Las CMI₉₀ fueron obtenidas dentro del intervalo 4-8 mg/l para todos los agentes antimicrobianos con la excepción de cefaclor (128 mg/l) y azitromicina (> 8 mg/l). Sin embargo, los porcentajes de resistencia de cada agente antimicrobiano de acuerdo a los puntos de corte determinados por el CLSI fueron muy variables: amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico mostraron los valores más bajos de resistencia, siendo estos de 4,3 y 3,7% respectivamente, seguidos por azitromicina, cefpodoxima y cefuroxima, presentando unos valores desde 24,4 a 34,1% y finalmente cefaclor con un 69,90%. Los porcentajes de resistencia para cefixima y ceftibuteno no pudieron ser obtenidos al no disponer la CLSI de puntos de corte para estos dos agentes antimicrobianos.

Las cepas sensibles a penicilina, también fueron sensibles a amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico y cefpodoxima en su totalidad, seguidos por cefuroxima con un valor de 0,9%. Sin embargo frente a cefaclor mostró un 33,1% de cepas resistentes. En las cepas de sensibilidad intermedia a penicilina, frente a amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico mostraron un 0% de resistencia; frente a azitromicina, cefpodoxima y cefuroxima mostraron porcentajes desde un 15,4 a 18,7%, y frente a cefaclor aumentó a un 84,6%.

Finalmente, en los aislados resistentes a penicilina, amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico mostraron una resistencia de 13,5 y 11,5% respectivamente; los demás agentes presentaron menor actividad, con porcentajes del 55,2% para azitromicina, 84,4% para cefpodoxima, 87,5% para cefuroxima y 98,9% para cefaclor. Sin embargo, con la excepción de estos últimos agentes, la CMI₉₀ fue aproximadamente la misma mostrando un valor de 8 mg/l. Cefixima y ceftibuteno

presentaron menor actividad que cefpodoxima y cefuroxima pero mayor actividad que cefaclor, si tenemos en cuenta sus CMI₉₀.

Streptococcus pyogenes

Los aislados recogidos fueron los siguientes: 69 cepas (32,9%) en el año 2000, 116 (55,2%) en 1999, y 25 (11,9%) en 1998 o años anteriores.

Tabla 9. Actividad *in vitro* de varios agentes antimicrobianos frente *S. pyogenes* (CMI₅₀, CMI₉₀, rango y % de cepas sensibles, intermedias y resistentes).

Agente antimicrobiano	CMI ₅₀ (mg/l)	CMI ₉₀ (mg/l)	Rango (mg/l)	% Sens.	% Inter.	% Res.
Penicilina	0,06	0,06	0,015 - 0,125	100	0	0
Amoxicilina	0,03	0,06	0,015 - 0,125	- ¹	- ¹	- ¹
Amoxicilina/clav	0,03	0,06	0,015 - 0,125	- ¹	- ¹	- ¹
Cefaclor	0,5	2	0,06 - 2	- ¹	- ¹	- ¹
Cefixima	0,125	0,25	0,03 - 0,5	ND ²	ND ²	ND ²
Cefpodoxima	0,06	0,125	0,015 - 0,25	- ¹	- ¹	- ¹
Cefuroxima	0,06	0,125	0,015 - 0,25	- ¹	- ¹	- ¹
Ceftibuteno	0,5	1	0,06 - 4	- ¹	- ¹	- ¹
Azitromicina	0,125	2	0,015 - 4	80,00	8,57	11,43

¹ Todas las cepas sensibles a penicilina se consideran sensibles a amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, cefpodoxima, cefuroxima, ceftibuteno y cefaclor (CLSI).

² ND, no disponibles los puntos de corte por el CLSI.

La tabla 9 muestra los resultados de las determinaciones de CMI para este microorganismo. La sensibilidad a penicilina fue del 100%, con una CMI₉₀ de 0,06 mg/l. La misma CMI₉₀ fue mostrada por amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico, mientras que cefpodoxima y cefuroxima fueron una dilución menos activas (0,125 mg/l). La CMI₉₀ de cefixima fue similar (0,25 mg/l), pero cefaclor y ceftibuteno mostraron los valores más altos (2 y 1 mg/l respectivamente).

Finalmente, azitromicina fue bastante activa (CMI₉₀ = 2 mg/l), con un porcentaje de resistencia intermedia y alta de 8,6% y 11,4% respectivamente. Estas proporciones no fueron estadísticamente diferentes entre los años 1999 y 2000 (las cepas del año 1998 o anteriores no fueron incluidas en el análisis estadístico debido a su baja frecuencia). En los años 1999 y 2000 los porcentajes fueron respectivamente 81,1% y 78,2% de cepas sensibles, 6,1% y 8,7% de cepas intermedias, y 12,9% y 13,1% de cepas resistentes.

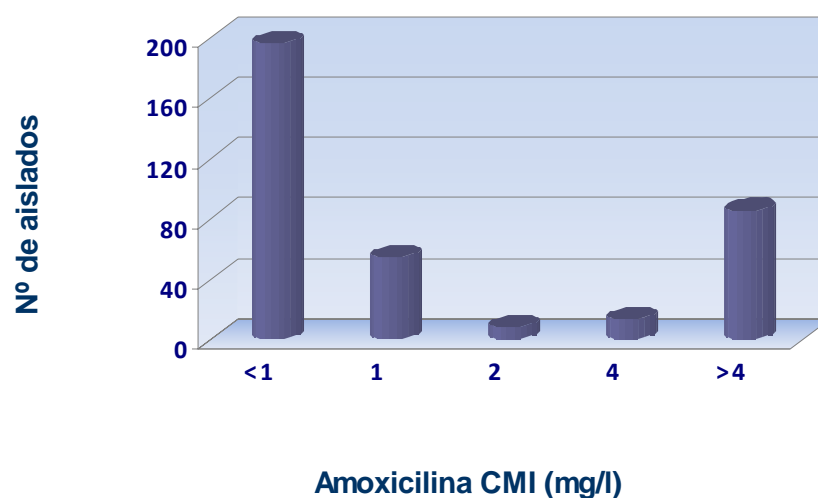
Haemophilus influenzae

El porcentaje de aislados recogidos más alto corresponde a este microorganismo. En el año 2000, un total de 153 cepas (42,4%) fueron enviadas al laboratorio central; en 1999, 192 aislados (53,2%) fueron recogidos, y en 1998 o años anteriores el número fue de 13 (3,6%).

Analizando el estudio globalmente, un total de 95 aislados fueron betalactamasa positivos (26,3%). Comparando los porcentajes de cepas betalactamasa positivas del año 2000 frente al año 1999, no fueron encontradas diferencias significativas, aunque los porcentajes durante el año 1999 fueron aproximadamente el 7% más alto que los del año 2000 (30,2 frente 22,8%).

Los aislados de *H. influenzae* fueron clasificados de acuerdo a las CMI's que presentaban a amoxicilina. La distribución de los valores de CMI a amoxicilina se ilustran en la figura 11, donde todos los valores fueron representados dentro del intervalo de dilución de <1 y >4 mg/l, que son los puntos de corte para ampicilina, según el CLSI. Del total de cepas aisladas, 252 cepas fueron sensibles a la amoxicilina, 9 cepas mostraron resistencia intermedia y 100 cepas presentaron alto nivel de resistencia a amoxicilina.

Figura 11. Sensibilidad a amoxicilina de 361 aislados de *H. influenzae*.



En referencia a la sensibilidad antimicrobiana, (tabla 10), el porcentaje de cepas resistentes a amoxicilina (27,7%, determinado con los puntos de corte de ampicilina) es aproximadamente el mismo que el porcentaje de betalactamasas positivas (26,3%). Sin embargo, 6 aislados (1,6%) mostraron actividad betalactamasa-negativa pero fueron totalmente resistentes a amoxicilina (probablemente eran cepas

resistentes a la ampicilina no productoras de betalactamasas (BLNAR)) (Barry, AL. y cols., 2001); otro 1,1% de estos aislados fueron de sensibilidad intermedia a amoxicilina.

Todas las cepas fueron completamente sensibles a los agentes antimicrobianos ensayados a excepción de cefaclor, frente al cual mostró un pequeño porcentaje de cepas resistentes o intermedias (1,9% y 3,3% respectivamente).

Tabla 10. Actividad *in vitro* de varios agentes antimicrobianos frente *H. influenzae* (CMI₅₀, CMI₉₀, rango y % de cepas sensibles, intermedias y resistentes).

Agente antimicrobiano	CMI ₅₀ (mg/l)	CMI ₉₀ (mg/l)	Rango (mg/l)	% Sens.	% Inter.	% Res.
Penicilina	2	>16	0,5 - >16	ND ^a	ND ^a	ND ^a
Amoxicilina	0,5	>64	0,125 - >64	69,8 ^b	2,5 ^b	27,7 ^b
Amoxicilina/clav	0,5	1	0,06 - 4	100	-	0
Cefaclor	2	8	0,03 - 64	94,7	3,3	1,9
Cefixima	0,03	0,125	<0,015 - 0,5	100	-	0
Cefpodoxima	0,06	0,25	0,03 - 1	100	-	0
Cefuroxima	1	2	0,25 - 4	100	-	0
Ceftibuteno	0,06	0,25	0,03 - 2	100	-	0
Azitromicina	0,125	0,25	0,03 - 1	100	-	0

^a ND, no disponibles los puntos de corte por el CLSI.

^b Punto de corte para ampicilina

Moraxella catarrhalis

Un total de 107 aislados de este microorganismo fueron recogidos durante el periodo de estudio, de los cuales 34 cepas (31,8%) fueron aisladas en el año 2000, 67 (62,6%) en 1999 y 6 (5,6%) en 1998 o en años anteriores.

Los resultados de sensibilidad se muestran en la tabla 11. Los agentes antimicrobianos más activos fueron azitromicina, con una CMI₉₀ de 0,06 mg/l, seguidos de amoxicilina/ácido clavulánico y cefixima (0,5 mg/l). Frente cefpodoxima mostró una CMI₉₀ de 2 mg/l, más baja que cefuroxima que era de 4 mg/l, y que otras cefalosporinas orales como ceftibuteno y cefaclor, y también más bajas que las CMI₉₀ mostradas por amoxicilina y penicilina.

Tabla 11. Actividad *in vitro* de varios agentes antimicrobianos frente *M. catarrhalis* (CMI₅₀, CMI₉₀ y rango).

Agente Antimicrobiano	CMI ₅₀ (mg/l)	CMI ₉₀ (mg/l)	Rango (mg/l)
Penicilina	8	>16	0,06 - >16
Amoxicilina	4	8	0,03 - >8
Amoxicilina/clav	0,125	0,5	0,015 - 4
Cefaclor	1	4	0,125 - 8
Cefixima	0,25	0,5	0,06 - 1
Cefpodoxima	1	2	0,06 - 2
Cefuroxima	1	4	0,125 - 4
Ceftibuteno	2	4	0,125 - 8
Azitromicina	0,03	0,06	<0,03 - 0,125

2. - Estudio para la caracterización molecular de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a amoxicilina.

Se seleccionaron 55 aislados de *S. pneumoniae*, procedentes del Instituto Carlos III, que presentaban sensibilidad disminuida frente a amoxicilina (CMI ≥ 4 mg/l) con el fin de obtener una muestra representativa para determinar mediante electroforesis de campo pulsado cuáles son los diferentes clones presentes en cepas con alta resistencia a amoxicilina en España.

La distribución de los aislados resistentes a amoxicilina de acuerdo al distinto nivel de resistencia (CMI) fue de 23,52, 70,58 y 5,88% para las CMI de 4, 8, 16 mg/l, respectivamente (**tabla 12**).

Tabla 12. Distribución de 51 aislados resistentes a amoxicilina respecto al grado de resistencia a amoxicilina (CMI).

<i>S. pneumoniae</i>	CMI a amoxicilina (mg/l)		
	4	8	16
Nº de cepas (%)	12 (23,52%)	36 (70,58%)	3 (5,88%)

En la **tabla 13** Se recogen los resultados de sensibilidad (CMI y CMB) que presentan todos estos aislados seleccionados frente a amoxicilina y amoxicilina-clavulánico. Así como también los serotipos y los perfiles obtenidos por la digestión con *SmaI* en el PFGE.

Tabla 13. Sensibilidad de los aislados resistentes a amoxicilina y amoxicilina-clavulánico, serotipo y clon de resistencia.

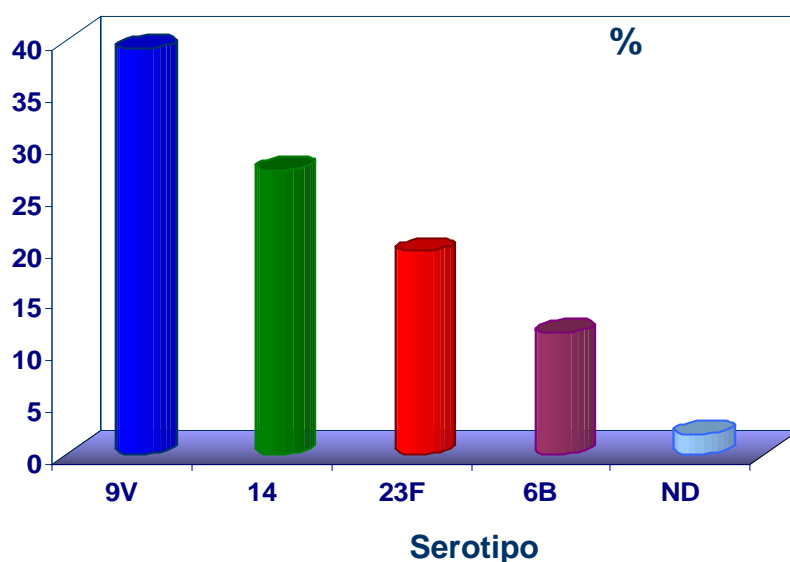
Cepa	CMI (mg/l)		CMB (mg/l)		serotipo	clon
	Amox	Amox/clav	Amox	Amox/clav		
N-1513	16	16	16	16	14	Spain ¹⁴ -5
N-1632	16	16	16	16	14	France ^{9V} -3
N-340	16	8	16	16	6B	único
N-320	8	8	8	8	6	Spain ^{23F} -1
N-349	8	8	8	8	9	France ^{9V} -3
N-433	8	8	16	16	9	France ^{9V} -3
N-825	8	8	16	16	ND	único
N-902	8	8	8	8	23	France ^{9V} -3
N-1170	8	8	8	8	14	Spain ¹⁴ -5
N.1245	8	8	8	8	14	Spain ¹⁴ -5
N.1277	8	8	16	16	23	Spain ^{23F} -1
N.1517	8	8	8	8	14	Spain ^{23F} -1
N-1686	8	8	8	8	23	Spain ^{23F} -1
N-1225	8	8	8	8	6B	Spain ^{6B} -2
N-181	8	4	16	16	9V	France ^{9V} -3
N-155	8	8	16	8	14	France ^{9V} -3
N-267	8	8	8	8	14	único
N-875	8	8	8	8	14	Spain ¹⁴ -5
N-26	8	8	16	8	23F	Spain ^{23F} -1
N-254	8	8	16	32	23F	Spain ^{23F} -1
N-667	8	8	16	16	23F	Spain ^{23F} -1
N-1496	8	8	8	8	14	Spain ^{23F} -1
N-1500	8	8	8	8	14	Spain ¹⁴ -5
N-1598	8	8	8	8	6	Spain ^{6B} -2
N-2862	8	8	32	32	23F	Spain ^{23F} -1
N-42	8	8	8	8	9V	France ^{9V} -3

Cepa	CMI (mg/l)		CMB (mg/l)		serotipo	clon
	Amox	Amox/clav	Amox	Amox/clav		
N-181	8	8	8	8	9V	France ^{9V} -3
N-147	8	8	8	8	14	Spain ¹⁴ -5
N-278	8	8	8	8	9V	France ^{9V} -3
N-2452	8	8	8	8	23F	France ^{9V} -3
N-2652	8	8	16	16	23F	France ^{9V} -3
N-328	8	8	8	8	9V	France ^{9V} -3
N-818	8	8	8	8	9V	France ^{9V} -3
N-862	8	4	8	8	9V	France ^{9V} -3
N-1196	8	8	8	8	9V	France ^{9V} -3
127	8	8	8	8	9	France ^{9V} -3
498	8	4	8	8	6	Spain ^{6B} -2
N.1474	8	4	8	8	9	France ^{9V} -3
N-1331	8	4	8	4	9V	France ^{9V} -3
N-152	4	4	8	8	14	France ^{9V} -3
N-916	4	4	4	4	9	único
N-1044	4	4	16	16	14	único
N.1229	4	4	8	8	9	France ^{9V} -3
N-1591	4	4	8	16	14	único
N-42	4	4	4	4	9V	France ^{9V} -3
N-198	4	4	4	4	9V	France ^{9V} -3
N-1432	4	4	4	4	9V	France ^{9V} -3
N-1996	4	8	4	8	6	Spain ^{6B} -2
N-182	4	4	4	4	9V	France ^{9V} -3
N-1209	4	4	4	4	9V	France ^{9V} -3
275	4	4	4	4	23F	Spain ^{23F} -1

ND: No disponible.

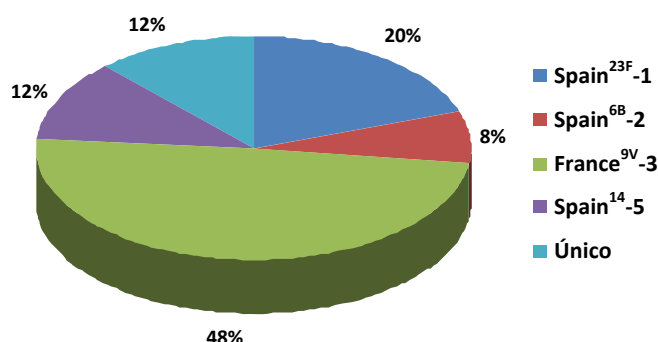
Respecto a la distribución de los serotipos de los aislados con sensibilidad disminuida frente a amoxicilina se muestra en la figura 12. Los diferentes porcentajes de mayor a menor frecuencia son el serotipo 9V (39,2%), 14 (27,4%), 23F (19,6%) y 6B (11,7%). No estaba disponible el serotipo del 1,9% de las cepas.

Figura 12. Distribución de las cepas de *S. pneumoniae* por serotipo.



Los diferentes clones obtenidos por PFGE han sido el France^{9V}-3, el Spain²³-1, el Spain¹⁴-5, el Spain^{6B}-2 y algunos clones únicos. Éstos se encuentran representados en la figura 13, con sus respectivos porcentajes. El clon France^{9V} es el mayoritariamente obtenido con un valor del 49%, frente al clon Spain^{6B}-2, que es el minoritariamente se ha obtenido con un porcentaje del 7%. Los demás clones presentan porcentajes similares.

Figura 13. Representación gráfica de todos los clones obtenidos por PFGE de *S. pneumoniae* con se



Los clones de los aislados resistentes (CMI = 8 y 16 mg/l) se muestran en la figura 14 y los de sensibilidad intermedia en la figura 15.

Figura 14. Representación gráfica de todos los clones resistentes a amoxicilina obtenidos por PFGE de *S. pneumoniae* (CMI = 8 y 16 mg/l).

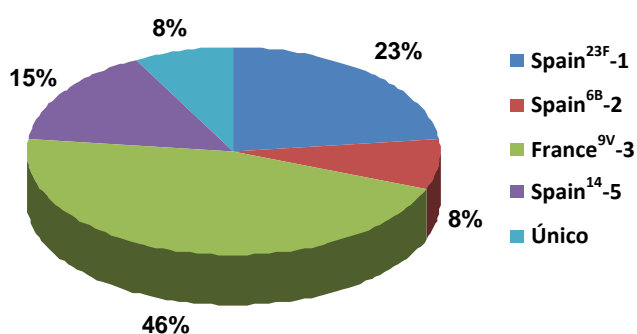
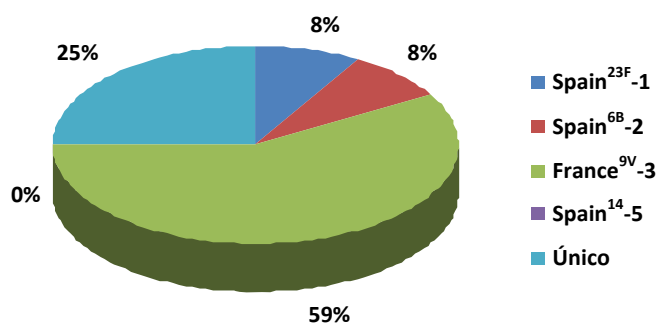


Figura 15. Representación gráfica de los clones resistentes con resistencia intermedia a amoxicilina obtenidos por PFGE de *S. pneumoniae* (CMI = 4 mg/l).



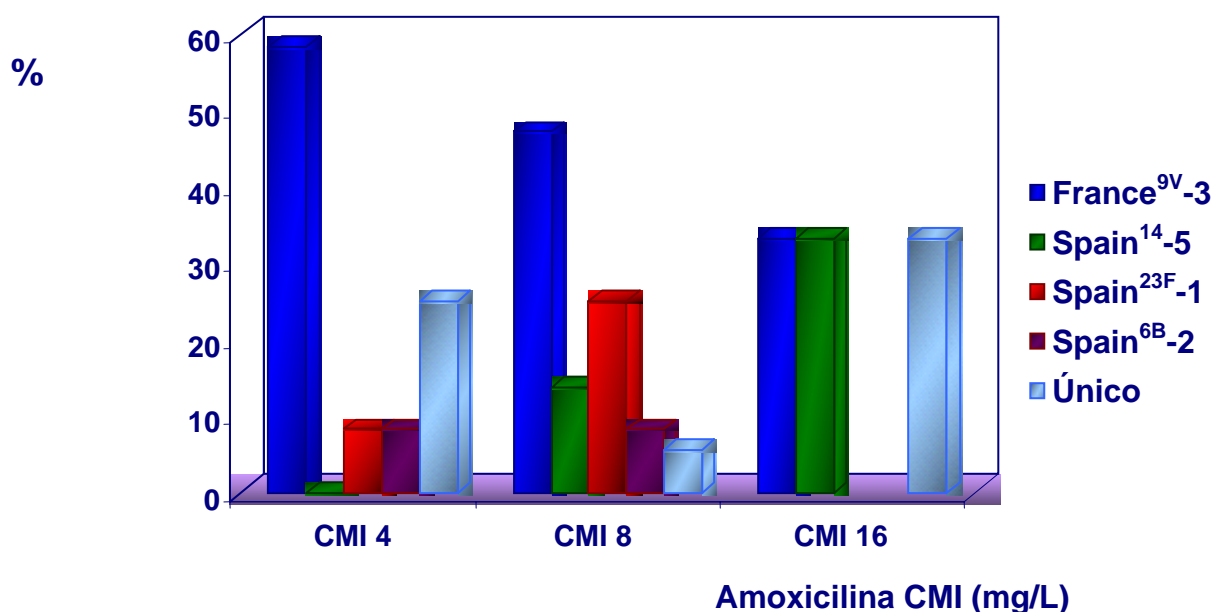
Relación entre la CMI a amoxicilina y los tipos clonales:

a) Según la CMI a amoxicilina

En la figura 16 se muestra que los aislados que tienen el mismo perfil de PFGE y mismo serotipo pueden presentar distinto nivel de resistencia a amoxicilina. De este modo, el clon France^{9V}-3 se encuentra presente, y en mayor frecuencia, que el resto de clones internacionales en los tres niveles de resistencia (CMI = 4, 8 y 16 mg/l) con valores del 58,3, 47,2, 33,3% respectivamente. El clon Spain¹⁴-5 sólo está presente en los aislados que presentan alto nivel de resistencia (CMI = 8 y 16 mg/l) a amoxicilina.

Sin embargo, los clones Spain^{23F}-1 y Spain^{6B}-2 están presentes en los aislados con CMI = 4 y 8 mg/l a amoxicilina, con porcentajes similares para ambos, salvo en los aislados con CMI = 8 mg/l, donde el clon Spain^{23F}-1 presenta mayor porcentaje que el clon Spain^{6B}-2.

Figura 16. Porcentaje de aislados de *S. pneumoniae* con perfil de PFGE con distintos niveles de resistencia a amoxicilina.



La tabla 14 muestra los aislados de cada clon según su sensibilidad a amoxicilina.

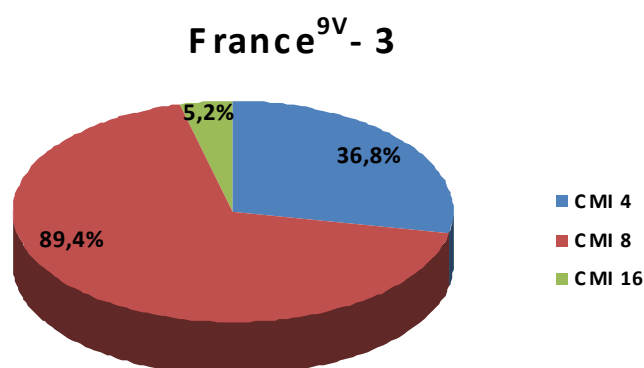
Tabla 14. Número de los diferentes clones de *S. pneumoniae* de acuerdo a la CMI a amoxicilina y entre paréntesis sus respectivos porcentajes.

CMI (mg/l)	France ^{9V} -3	Spain ¹⁴ -5	Spain ²³ -1	Spain ^{6B} -2	Único
CMI 4	7 (58,3)	-	1 (8,3)	1 (8,3)	3 (25,0)
CMI 8	17 (47,2)	5 (13,8)	9 (25)	3 (8,3)	2 (5,5)
CMI 16	1 (33,3)	1 (33,3)	-	-	1 (33,3)

b) Según el tipo clonal

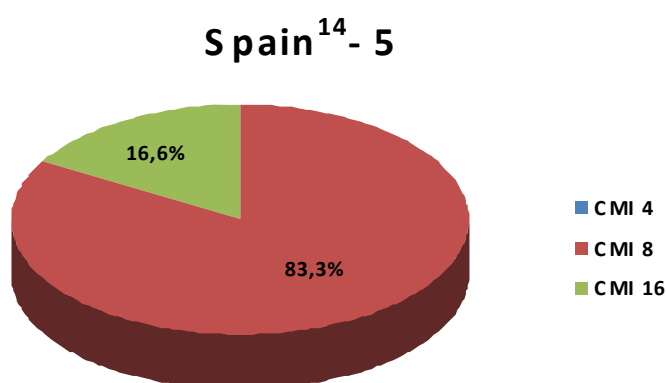
La representación del clon France^{9V}-3 según su sensibilidad frente a amoxicilina (CMI = 4, 8 y 16 mg/l) se encuentra representado en la figura 17. El porcentaje mayoritario lo presentó en los aislados que presentan una CMI = 8 mg/l para amoxicilina, sin embargo es minoritario en los aislados con CMI = 16 mg/l.

Figura 17. Porcentaje del clon France^{9V}-3 en los aislados según su sensibilidad a amoxicilina.



En cuanto al clon Spain¹⁴-5 sólo se encuentra presente en los aislados con alta resistencia frente a amoxicilina (CMI = 8 y 16 mg/l). En la figura 18 se muestran los diferentes porcentajes para las mismas .

Figura 18. Porcentaje del clon Spain¹⁴-5 en los aislados según su sensibilidad a



amoxicilina.

En cuanto a los clones Spain^{23F}-1 y Spain^{6B}-2 se encuentran en los aislados con resistencia de CMI = 4 y 8 mg/l frente a amoxicilina, y no en los aislados con CMI =16 mg/l. En la figura 19 se exponen los aislados con diferentes resistencias frente a amoxicilina para el clon Spain^{23F}-1, presentandose mayoritariamente en los aislados con CMI = 8 mg/l, con un porcentaje del 90%.

La figura 20 muestra los valores del clon Spain^{6B}-2. Ha sido el clon menos frecuente, aunque como en el resto es mayoritario en los aislados de CMI = 8 mg/l con un porcentaje del 75%

Figura 19. Porcentaje del clon Spain^{23F}-1 en los aislados según su sensibilidad a amoxicilina.

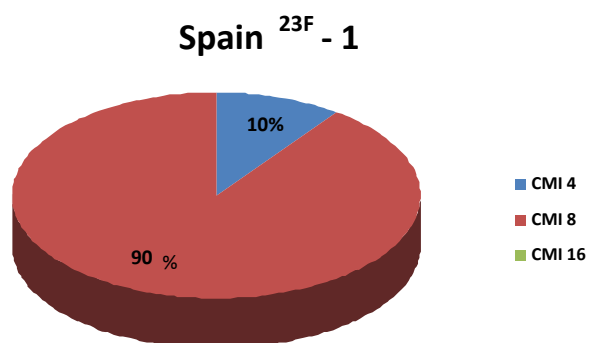
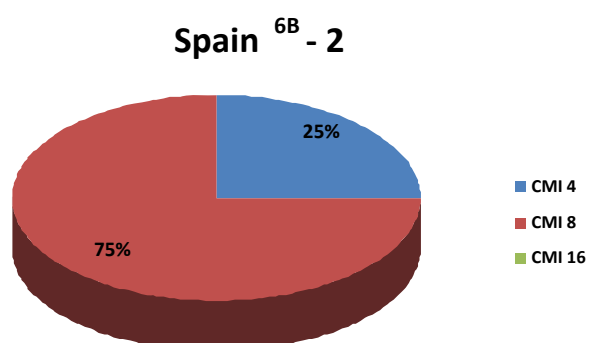


Figura 20. Representación gráfica del porcentaje de obtención del clon Spain^{6B}-2 en los aislados con diferentes sensibilidades frente a amoxicilina.



3. - Estudio PK/PD de amoxicilina 2000 mg SR y amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg.

3.1. Estudios de sensibilidad

En la **tabla 15** se recoge los resultados de sensibilidad en la determinación de la CMI y la CMB realizadas según la CLSI, con caldo Mueller-Hinton suplementado con un 5% de sangre de cordero. Estos resultados se expresan en diluciones dobles seriadas.

Tabla 15. Sensibilidad a amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico en caldo Mueller-Hinton.

<i>S. pneumoniae</i>	CMI (mg/l)		CMB (mg/l)	
	Amox.	Amox- clav	Amox.	Amox- cla
N-340	16	8	16	16
N-26	8	8	16	8
N-267	8	8	8	8
N-1245	8	8	8	8
127	8	8	8	8
498	8	4	8	8
N-152	4	4	4	4
N-275	4	4	4	4
N-1229	4	4	8	8
N-916	4	4	4	4

Se realizó también la determinación de la sensibilidad de los mismos aislados en caldo Todd-Hewitt (**tabla 16**), ya que las simulaciones farmacodinámicas se realizaron con caldo Todd-Hewitt. Se ha visto que no hay diferencias significativas entre los resultados de las dos metodologías. Los resultados son expresados en diluciones dobles seriadas y entre paréntesis se expresa en diluciones de 1mg/l.

Tabla 16. Sensibilidad a amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico en caldo Todd-Hewitt.

<i>S. pneumoniae</i>	CMI (mg/l)		CMB (mg/l)	
	Amox.	Amox- clav	Amox.	Amox- cla
N-340	16 (9)	8 (8)	16 (9)	16 (9)
N-26	8 (8)	8 (8)	16 (9)	16 (9)
N-267	8 (7)	8 (7)	16 (9)	16 (9)
N-1245	8 (7)	8 (7)	8 (8)	8 (7)
127	8 (6)	8 (7)	8 (6)	8 (7)
498	8 (5)	8 (6)	8 (5)	8 (6)
N-152	4 (4)	4 (4)	8 (6)	4 (4)
N-275	4 (4)	4 (4)	4 (4)	4 (4)
N-1229	4 (4)	4 (4)	4 (4)	4 (4)
N-916	4 (3)	8 (7)	8 (5)	8 (7)

En base a los resultados se seleccionaron para este estudio:

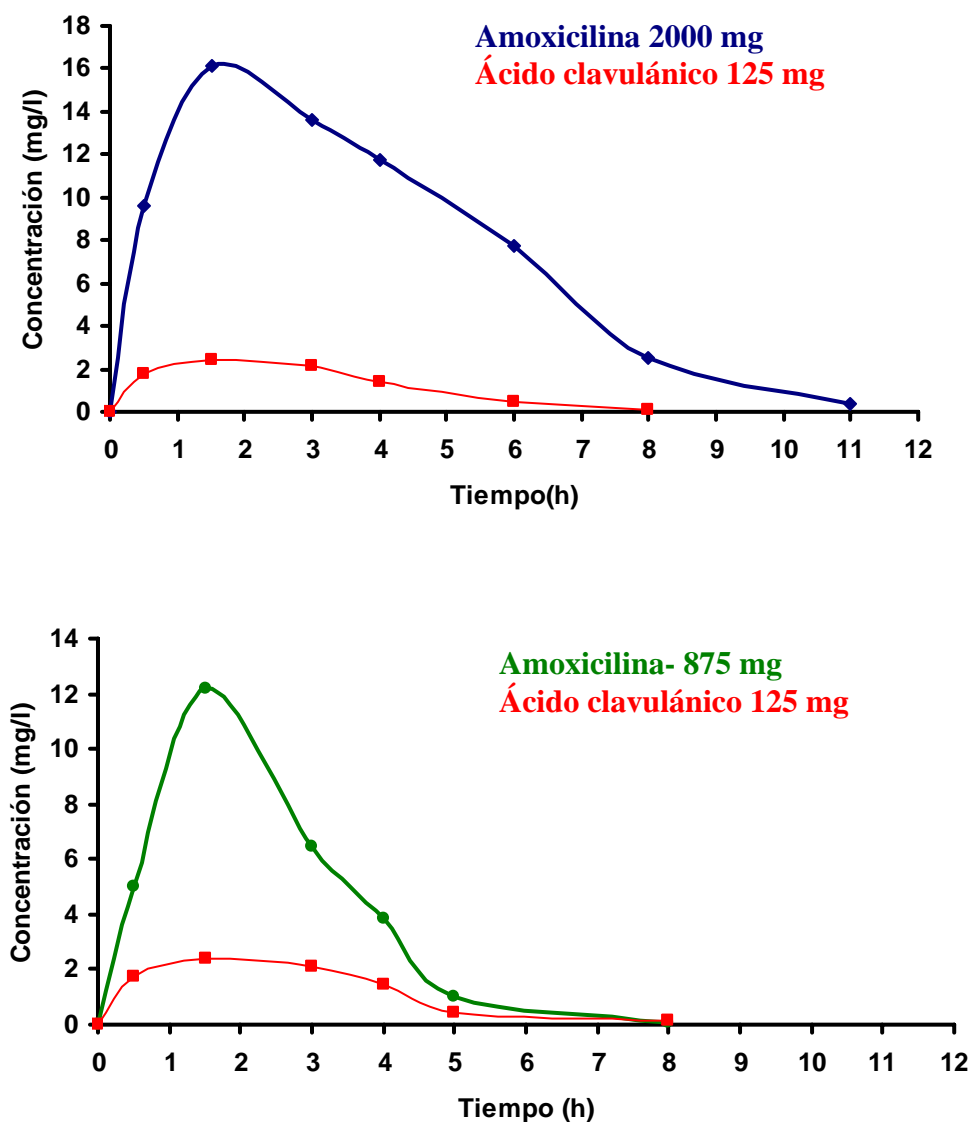
- cuatro aislados con CMI = 4 mg/l, concretamente:
 - el aislado N-916, con CMI = 3 mg/l
 - los aislados N-275, N-1229 y N-152, con CMI = 4 mg/l
- cinco aislados con CMI = 8 mg/l:
 - 498, CMI = 5 mg/l,
 - 127, CMI = 6 mg/l,
 - N-1245 y N-267, con CMI = 7 mg/l,
 - N-26 con CMI = 8 mg/l
- Un aislado con CMI = 16 mg/l
 - N-340, con CMI = 9 mg/l

3.2. Estudios farmacocinéticos

El perfil farmacocinético de las concentraciones séricas de amoxicilina 2000 mg (de liberación sostenida) y amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg obtenidas en los ensayos microbiológicos y simuladas durante todos los experimentos se encuentran representados en la figura 21.

Las concentraciones máximas séricas simuladas (C_{max}) fueron de $16,1 \pm 0,3$ mg/l y $12,2 \pm 2,0$ mg/l, y la concentración sérica del área bajo la curva (ABC) fue de $84,0 \pm 5,1$ mg.h/l y $33,0 \pm 4,9$ mg.h/l para amoxicilina 2000 mg y 875 mg respectivamente.

Figura 21. Perfiles (dosis única) de las concentraciones séricas observadas sobre el tiempo para amoxicilina-ácido clavulánico 2000/125 mg de liberación sostenida, amoxicilina- ácido clavulánico 875/125 mg.



Estos parámetros farmacocinéticos obtenidos se sitúan en el rango obtenido en humanos y en otras simulaciones farmacodinámicas (Löwdin, E., 2002). Los obtenidos son similares a los encontrados en humanos para cada formulación (tabla 17).

Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos simulados en el modelo *in vitro*.

	Tmax	Cmax	AUC
Amoxicilina 2000 mg (SR)	1,5 ± 0,0	16,095 ± 0,3	80,456 ± 4,720
Amoxicilina/clavulánico 875-125 mg	1,5 ± 0,0	12,188 ± 1,136	31,521 ± 2,707
Ácido clavulánico 125 mg	1,5 ± 0,0	2,391 ± 0,144	6,456 ± 0,566

Tabla 18. Parámetros farmacodinámicos calculados a partir de la farmacocinética conseguida *in vitro* con amoxicilina 2000 mg administrado cada 12h y amoxicilina/clavulánico 875-125 mg administrado cada 8h.

Cepa	T>CMI (%)		Cmax/CMI	
	Amox SR	Co-Amox 875	Amox SR	Co-Amox 875
N-340 (CMI 9 mg/l)	46,1	21,0	2,01	1,52
N-26 (CMI 8 mg/l)	46,1	21,0	2,01	1,52
N-267 (CMI 7 mg/l)	49,6	25,9	2,30	1,74
N-1245 (CMI 7 mg/l)	49,6	25,9	2,30	1,74
127 (CMI 6 mg/l)	52,9	31,5	2,68	2,03
498 (CMI 5 mg/l)	57,8	38,0	3,22	2,44
N-152 (CMI 4 mg/l)	59,4	44,6	4,02	3,05
N-275 (CMI 4 mg/l)	59,4	44,6	4,02	3,05
N-1229 (CMI 4 mg/l)	59,4	44,6	4,02	3,05
N-916 (CMI 3 mg/l)	63,0	50,1	5,37	4,06

Teniendo en cuenta la sensibilidad de los aislados seleccionados, se consiguió un tiempo de exposición ($T > CMI$) que osciló entre un 21 y 50% para la formulación convencional de amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg y de un 46-63% para la formulación de liberación sostenida (tabla 18).

3.3. Farmacodinámica en el sistema *in vitro*.

a) Actividad antimicrobiana de amoxicilina SR 2000 mg y amoxicilina/ ácido clavulánico 875/125 mg (media \pm SD).

La figura 22 muestra la muerte bacteriana a lo largo del tiempo producida por amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg y amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg frente a los aislados con CMI = 3 y 4 mg/l. La actividad desarrollada por la formulación con farmacocinética extendida (Amoxicilina SR) tras la administración de dos dosis consecutivas cada 12 h (24 h de tratamiento) demostró ser bactericida, con más de 3 Log de reducción (>99,9%) sobre los aislados de CMI 4 mg/l. La segunda administración a las 12 h reflejó un incremento en la muerte bacteriana de las cepas con CMI de 4 mg/l, erradicando por completo 2 de las 4 cepas estudiadas.

La actividad desarrollada por la formulación amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg cada 8 h fue máxima durante la primera administración, concretamente a las 6 h tuvo una reducción de más de tres 3 Log de reducción (>99,9%) y a las 8 h presentaron reducciones logarítmicas similares del $99,37\% \pm 0,65$ para los grupos de CMI 4 mg/l (Tabla 16).

En las figuras 23-24 se muestra la muerte bacteriana a lo largo del tiempo producida por amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg y amoxicilina/ácido

clavulánico 875/125 mg frente a los aislados con CMI = 5-9 mg/l. La actividad desarrollada por la formulación con farmacocinética extendida (amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg) tras la administración de dos dosis consecutivas cada 12 h (24 h de tratamiento) presentó unas reducciones superiores a 2 Log de reducción para las cepas de CMI \geq 8 mg/l, a excepción de los aislados N-267 (CMI, 7 mg/l) y N-340 (CMI, 9 mg/l), en los que las reducciones oscilaron entre 1 y 2 Log. Para estas cepas la reducción global fue del 94,78% \pm 11,83, respecto al inóculo inicial.

La media de los porcentajes de la reducción del inóculo inicial en las 24 h que duró el experimento, con la utilización de tres dosificaciones para amoxicilina 875 mg (0, 8 y 16 h) y dos para amoxicilina 2000 mg (0 y 12 h) se muestran en la **tabla 19**, para las cepas con CMI de 4 y \geq 8 mg/l. Aunque no existieron diferencias estadísticas significativas entre ambos tratamientos con las cepas de CMI=4 mg/l, a los tiempos 8, 12 o 16 h, estas si fueron evidentes ($P=0,028$) al final de los tratamientos (24 h), donde la reducción observada para la formulación de liberación sostenida fue del 100% \pm 0,13 mientras que para el tratamiento amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg el recrecimiento observado de bacteriano fue generalizado de $1.310,55 \pm 1.741,22$.

La actividad desarrollada por la formulación amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg cada 8 h fue máxima durante la primera administración a las 6 h (>99%) con reducciones a las 8 h del $98,31 \pm 2,76$ para los grupos CMI 8 mg/l (Tabla 19). La segunda administración a las 12 h en las cepas del grupo de CMI 8 mg/l fue muy similar a la encontrada al final del estudio, con una reducción porcentual, del $99,5\% \pm 0,67$ vs. $94,78\% \pm 11,83$ para las horas 12 y 24 h, respectivamente.

Figura 22. Actividad antimicrobiana desarrollada por amoxicilina/clavulánico 2000/125mg (rojo) y amoxicilina/clavulánico 875/125mg (azul) frente a cepas de *S. pneumoniae* con CMI = 3 mg/l (N-916) y CMI = 4 mg/l (N-152, N-1229, N-275) a amoxicilina/ácido clavulánico.

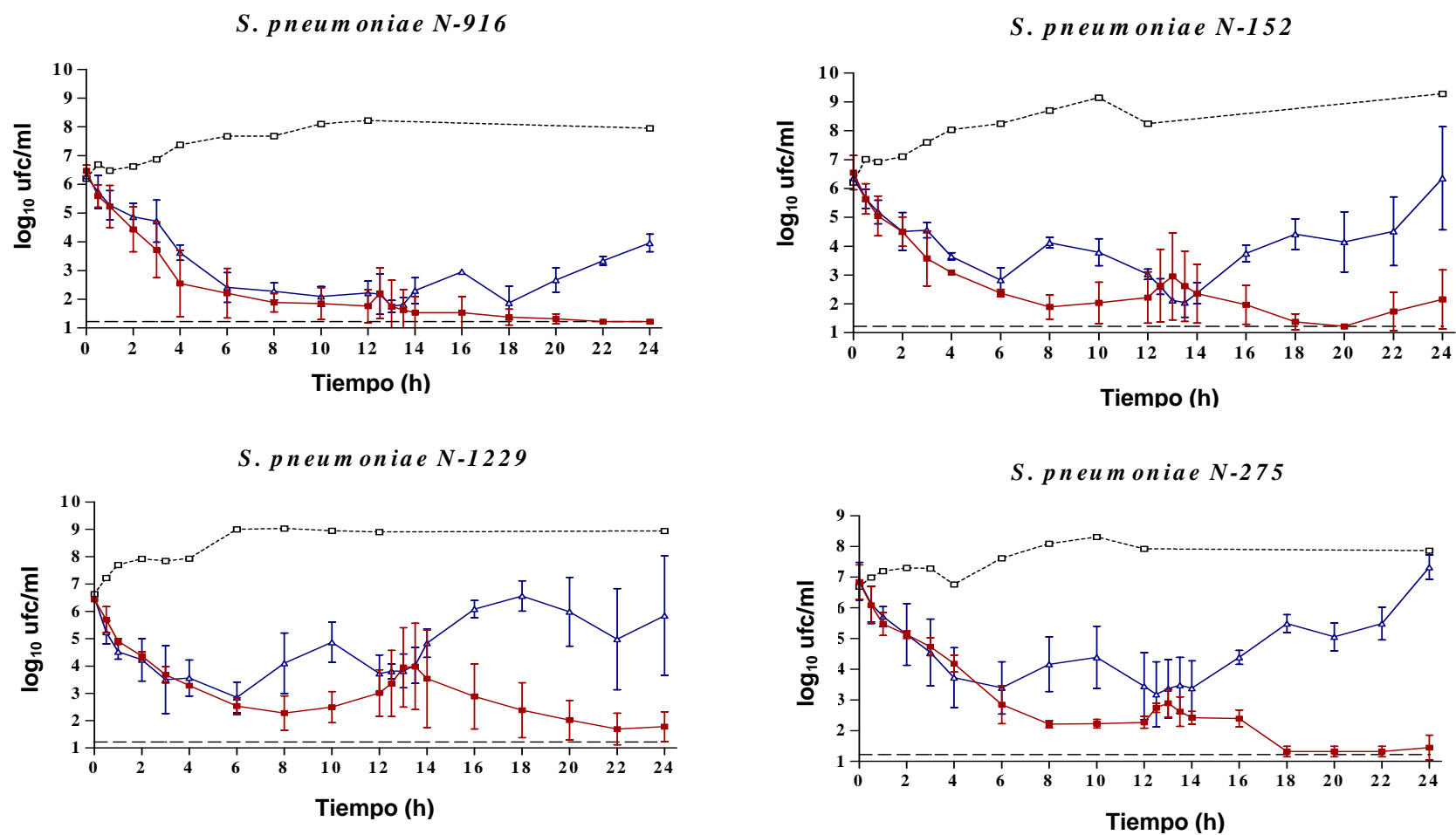


Figura 23. Actividad antimicrobiana desarrollada por amoxicilina/clavulánico 2000/125mg (rojo) y amoxicilina/clavulánico 875/125mg (azul) frente a cepas de *S. pneumoniae* con CMI = 5 mg/l (498); CMI = 6 mg/l (127) y CMI = 7 mg/l (N-267, N-1245) a amoxicilina/ácido clavulánico.

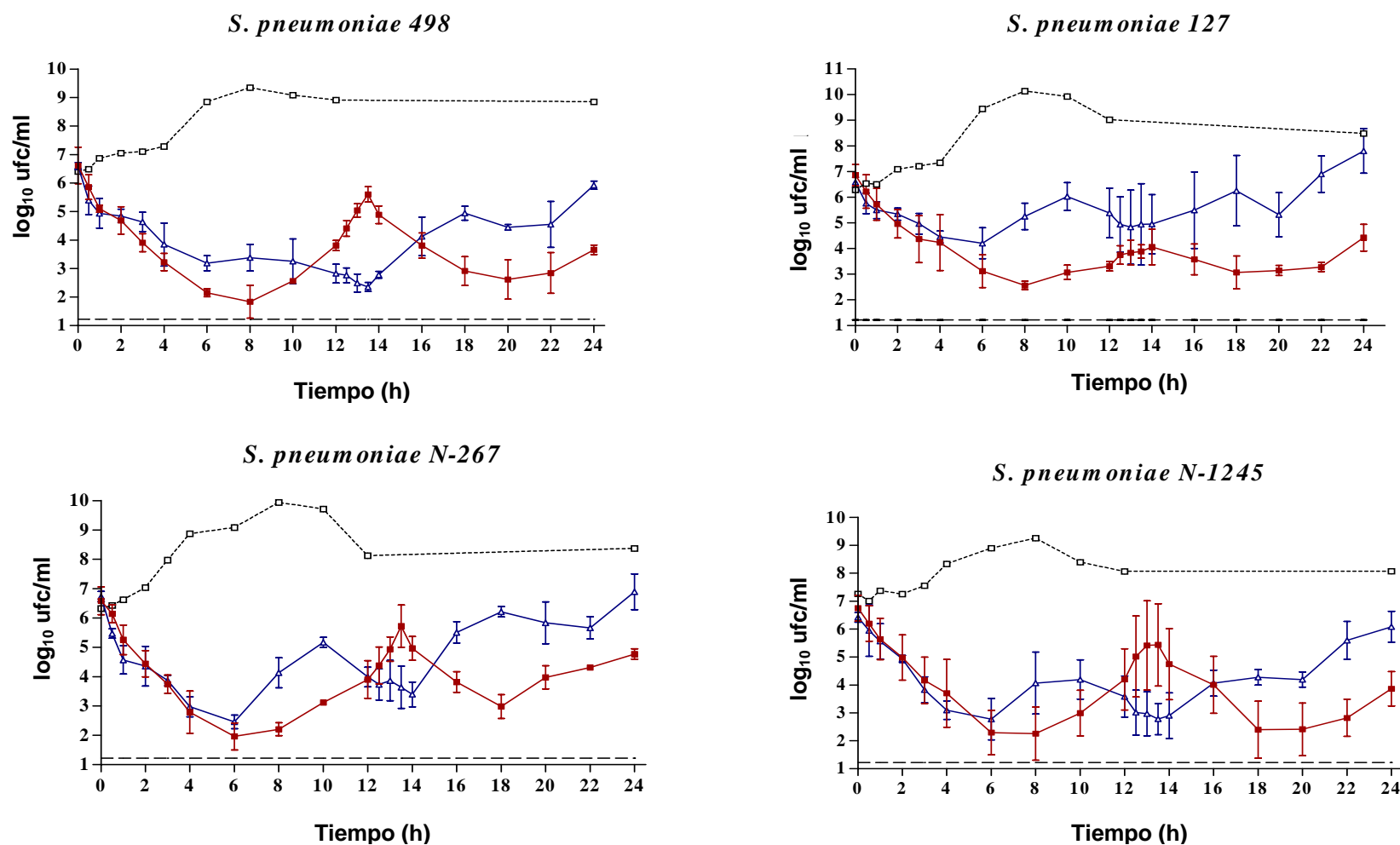


Figura 24. Actividad antimicrobiana desarrollada por amoxicilina/clavulánico 2000/125mg (rojo) y amoxicilina/clavulánico 875/125mg (azul) frente a cepas de *S. pneumoniae* con CMI = 8 mg/l (N-26) y CMI = 9 mg/l (N-340) a amoxicilina/ácido clavulánico.

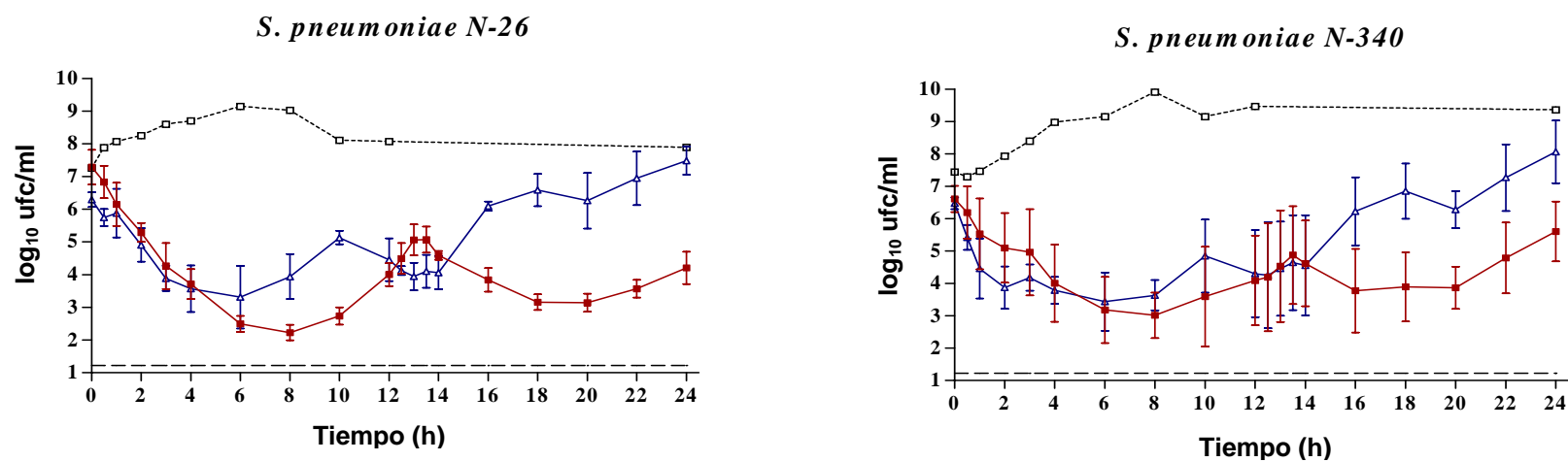


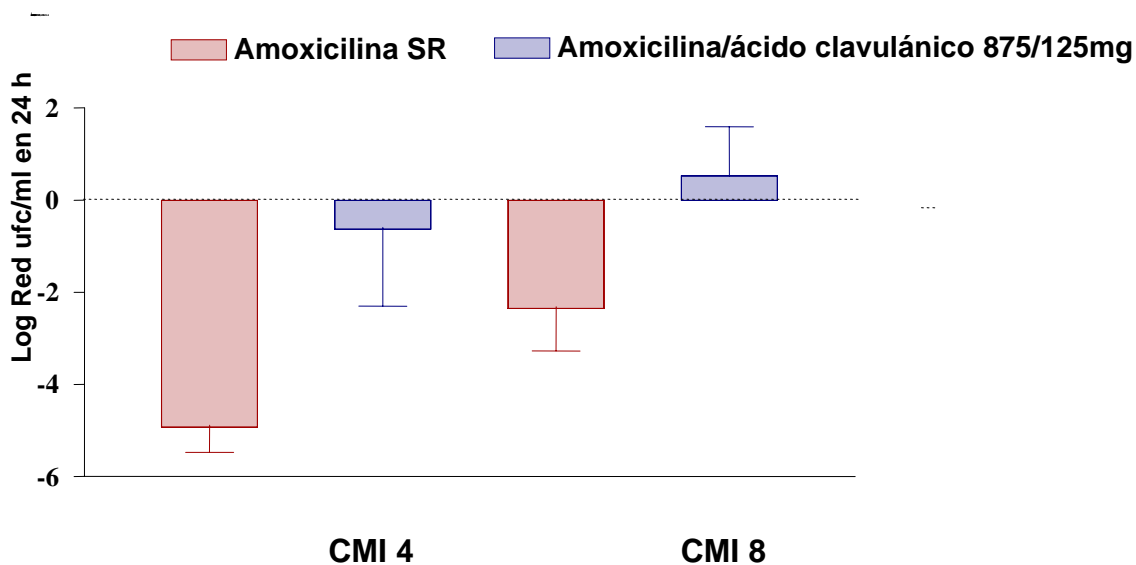
Tabla 19. Reducción del inóculo inicial a lo largo de 24 h frente a cuatro aislados con CMI 4 mg/l y cinco aislados con CMI ≥ 8 mg/l

Tiempo (h)	CMI = 4 mg/l		CMI ≥ 8 mg/l	
	Amoxicilina SR 2000 mg	Amoxicilina 875/125 mg	Amoxicilina SR 2000 mg	Amoxicilina 875/125 mg
0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
0,5	-82,58 \pm 6,40	-77,55 \pm 15,69	-61,85 \pm 18,67	74,44 \pm 27,25
1	-95,00 \pm 3,23	-92,85 \pm 5,89	-89,57 \pm 7,27	-79,06 \pm 36,64
2	-98,87 \pm 0,44	-96,95 \pm 1,95	-96,80 \pm 4,04	-94,67 \pm 3,52
3	-99,63 \pm 0,20 *	-97,53 \pm 2,67	-96,38 \pm 8,08	-99,06 \pm 1,02
4	-99,93 \pm 0,06	-99,81 \pm 0,07	-99,50 \pm 0,61	-99,67 \pm 0,28
6	-99,99 \pm 0,00 *	-99,97 \pm 0,01	-99,97 \pm 0,06*	-99,74 \pm 0,30
8	-100,00 \pm 0,01	-99,37 \pm 0,65	-99,99 \pm 0,02*	-98,31 \pm 2,76
10	-99,99 \pm 0,01	-98,46 \pm 2,46	-99,83 \pm 0,37*	-89,71 \pm 14,97
12	-99,97 \pm 0,06	-99,86 \pm 0,16	-99,50 \pm 0,67	-94,84 \pm 8,78
12,5	-99,83 \pm 0,31	-99,92 \pm 0,10	-96,81 \pm 5,21	-96,44 \pm 5,29
13	-99,06 \pm 1,82	-99,89 \pm 0,16	-91,32 \pm 14,37	-93,74 \pm 9,64
13,5	-99,46 \pm 1,06	-99,84 \pm 0,27	-86,55 \pm 14,15	-90,93 \pm 13,82
14	-99,70 \pm 0,59	-99,11 \pm 1,73	-97,85 \pm 2,26	-94,12 \pm 9,31
16	-99,98 \pm 0,05	-88,62 \pm 22,41	-99,70 \pm 0,39*	-38,65 \pm 79,37
18	-99,99 \pm 0,01	-55,38 \pm 86,35	-99,87 \pm 0,28*	112,51 \pm 239,32
20	-100,00 \pm 0,00 *	-27,37 \pm 142,33	-99,92 \pm 0,11*	-34 ,93 \pm 98,75
22	-100,00 \pm 0,00 *	-62,58 \pm 65,72	-98,71 \pm 2,95*	-300,17 \pm 546,35
24	-100,00 \pm 0,00 *	1310,55 \pm 1741,21	-94,78 \pm 11,83*	2482,24 \pm 3446,52

* P < 0,05 vs. 875 mg en el tiempo indicado

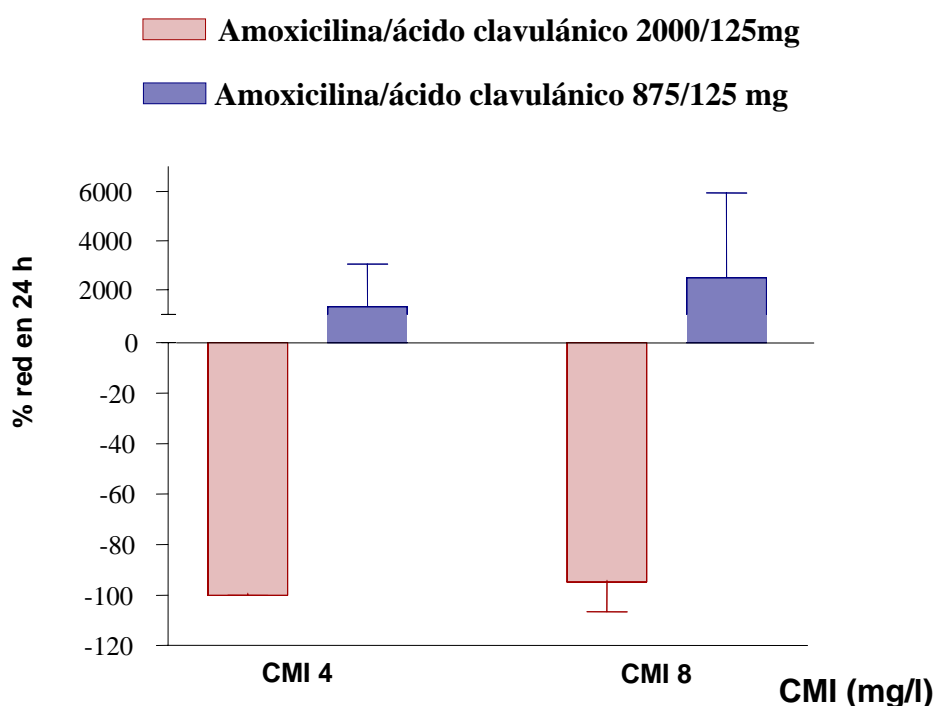
La actividad, en términos de reducción, descendió al $86,62\% \pm 22,41$ y $38,65 \pm 79,37$ en el momento de la administración de la segunda dosis ($T=16$ h), que se tradujo en recrecimientos por encima del inóculo inicial en 1 de las 4 cepas con CMI 4 mg/l y en 5 de las 7 cepas con CMI 8 mg/l al final del tratamiento (figuras 22-25). A pesar de mostrar mayores reducciones sobre las cepas de CMI=4 mg/l, para cada uno de los tiempos estudiados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de cepas a lo largo del ensayo ($P>0,066$).

Figura 25. Reducciones bacterianas en ufc/ml (\log_{10}) agrupadas por CMI (CMI= 4 y 8 mg/l) a amoxicilina tras la administración de amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg y amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg.



Al comparar la respuesta de la formulación entre ambos grupos de cepas (CMI=4 mg/l y CMI=8 mg/l), no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($P=0,066$) a las 12 h de iniciar el tratamiento. Sin embargo la reducción al finalizar el tratamiento mostró diferencias significativas ($P=0,01$) entre ambos grupos; CMI=4 mg/l; $100\% \pm 0,00$ y CMI=8 mg/l; $94,78\% \pm 11,8$ (figura 26).

Figura 26. Reducción porcentual del inóculo inicial tras la administración de las dosis de amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg y de amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg.



b) Farmacodinámica comparativa de ambas formulaciones.

En términos generales la formulación de amoxicilina de liberación sostenida mostró una mayor actividad a lo largo de las 24 h de tratamiento que la formulación convencional de amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg.

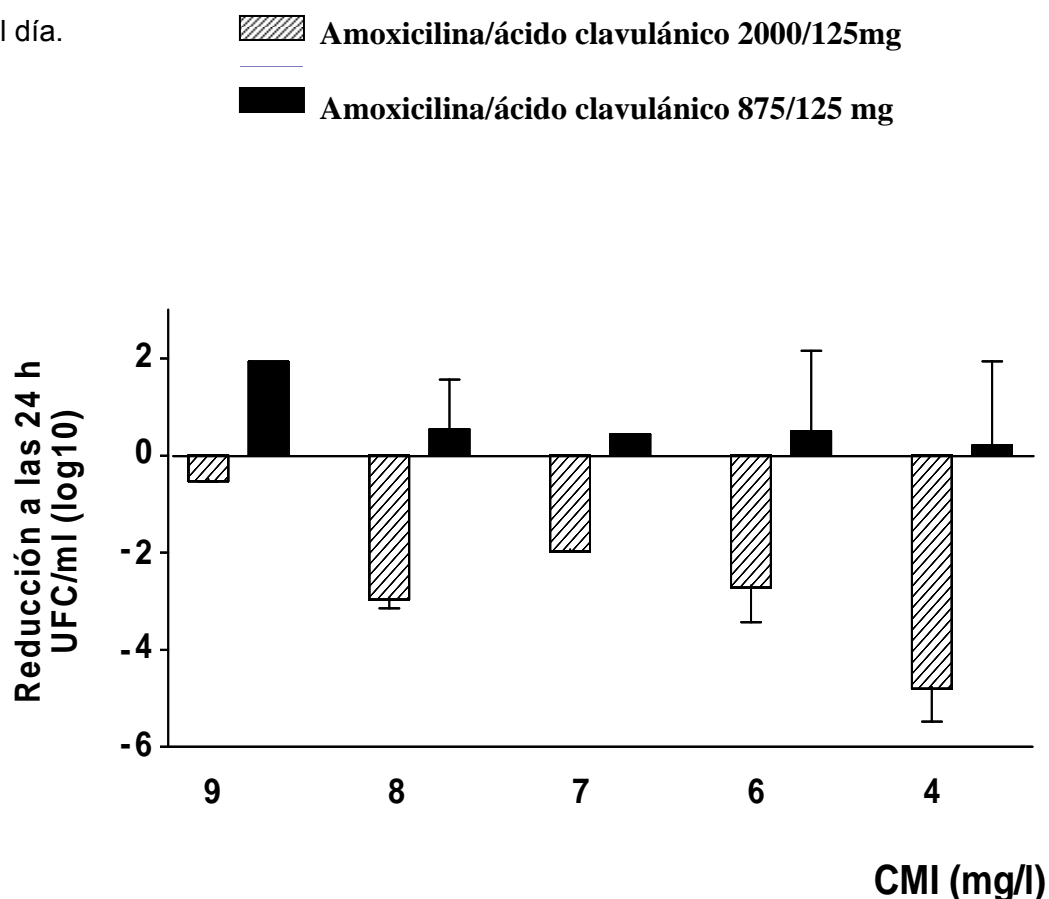
Por otro lado al comparar las reducciones de ambas formulaciones sobre las cepas de CMI=8 mg/l, estas diferencias se pudieron apreciar ya a las 8 h ($P=0,002$) y sobre todo a partir de las 16 h y hasta el final del estudio ($P<0,008$). A las 24 h se encontraron las diferencias más acusadas en la reducción logarítmica, $94,78\% \pm 11,8$ para amoxicilina de liberación lenta y de $2.482,24 \pm 3.446,52$ para la formulación convencional ($P=0,004$).

El tiempo necesario en alcanzar la actividad bactericida (reducción del 99,9 % respecto al inóculo a $T=0$) fue similar para ambas formulaciones cuando se analizaron las cepas con CMI=4 mg/l; 4 h para amoxicilina de liberación sostenida y 6 h para el tratamiento con amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg. En cambio con las cepas de CMI=8 mg/l existió un retraso de dos horas respecto a las cepas con CMI=4 mg/l para la formulación con farmacocinética modificada mientras que nunca se llegó a alcanzar con la formulación convencional.

Con amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg la reducción inicial de los inoculos fue $> 99,99\%$ para los aislados con CMI de 4mg/l, $> 99\%$ para los aislados con CMI de 8 mg/l, y 70,6% para los aislados con CMI de 16 mg/l durante las 24 h.

En la **figura 27** se muestran los valores medios y las desviaciones de estándar de las reducciones en ufc/ml (\log_{10}) a las 24 h de los aislados agrupados por los distintos valores de CMI tras la administración de amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg dos veces al día y amoxicilina /ácido clavulánico 875/125 mg tres veces al día.

Figura 27. Reducciones en ufc/ml (log10) a las 24 h de los aislados agrupados por los distintos valores de CMI tras la administración de amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg dos veces al día y amoxicilina /ácido clavulánico 875/125 mg tres veces al día.



c) Estudio de los posibles recrecimientos bacterianos (Selección de R).

Los resultados obtenidos en los estudios de sensibilidad de las colonias aisladas después del tratamiento con amoxicilina de liberación sostenida, se muestran en la tabla 20. En general no existieron diferencias considerables en los resultados respecto a la CMI inicial. Tres aislados reflejaron un incremento de la CMI en 1-2 mg/l (cepas N-267, 127 y 498) a amoxicilina, al igual que ocurre con oros aislados (cepas

N-267, 498 y N-916) a amoxicilina/ácido clavulánico. La CMB se vio incrementada para todos los aislados en 1-2 diluciones.

Tabla 20. Sensibilidad a amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico en caldo Todd-Hewitt a tiempo inicial y a las 24 h.

Sensibilidad a T=0/24 de los aislados (Amoxicilina 2000 mg SR).

<i>S. pneumoniae</i>	CMI (mg/l)		CMB (mg/l)	
	Amox.	Amox- clav	Amox.	Amox- cla
N-340	9/9	8/9	9/9	9/9
N-26	8/8	8/8	9/10	9/10
N-267	7/8	7/9	9/11	9/9
N-1245	7/8	7/8	8/10	7/9
127	6/8	7/7	6/8	7/8
498	5/8	6/8	5/8	6/8
N-152	4/4	4/4	4/6	4/6
N-275	4/4	4/4	4/4	4/4
N-1229	4/4	4/4	4/4	4/4
N-916	3/4	7/7	5/7	7/7

Discusión

1. Estudios de sensibilidad

Las infecciones respiratorias constituyen uno de los motivos más frecuentes de consulta en Atención Primaria de Salud. Su elevada frecuencia junto con la dificultad de un diagnóstico etiológico microbiológico causan una serie de inconvenientes actuales debido a la resistencia y los fracasos terapéuticos.

Dentro de las infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad hemos seleccionado a los agentes etiológicos más habituales, como son *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*. Estos patógenos fueron obtenidos de muestras procedentes de pacientes ambulatorios recogidas en varios hospitales españoles que fueron seleccionados según su distribución geográfica, con el fin de poder comparar los resultados entre las distintas Comunidades.

De la misma manera, se eligieron un grupo representativo de antibióticos dentro del arsenal terapéutico en Atención Primaria. Se seleccionaron los que más se utilizan frente a las infecciones que producen estos patógenos respiratorios, como son los agentes betalactámicos (penicilina, amoxicilina con o sin ácido clavulánico y alguna cefalosporina oral) y un macrólido (azitromicina).

La resistencia que presentan los patógenos comunes del tracto respiratorio frente a los agentes antimicrobianos utilizados para el tratamiento de estas infecciones ha surgido como uno de los problemas más importantes en el campo de las enfermedades infecciosas. Por lo tanto, son necesarios los estudios de vigilancia epidemiológica y microbiológica para estudiar la situación en la que se encuentran los patógenos respiratorios.

Desde que las primeras cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina que fueron aisladas en el periodo de 1960s y 70s (Kislak, JW. y cols., 1965; Hansman, D. y Bullen, MM., 1967), el porcentaje de sensibilidad disminuida ha aumentado en todo el

mundo, aunque hay que destacar que esta resistencia presenta variaciones geográficas (Felmingham, D. y cols., 2000; Hsueh, P. y cols., 2000; Tornøe, C. y cols., 1999; Baquero, F. y cols., 1991; Doren, G.V. y cols., 1996). Actualmente la prevalencia y los patrones de resistencia antibiótica en este microorganismo varían ampliamente entre los distintos países (Blondeau, J.M. y cols., 1999) e incluso dentro de un mismo país.

Uno de los países donde se estudiaron por primera vez los niveles y porcentajes de resistencia de cepas resistentes a penicilina fue España (Casal, J. 1982), y desde entonces se ha incrementado la aparición de cepas resistentes no sólo a este antibiótico sino también a otros grupos de antibióticos con diferentes patrones de resistencia (Fenoll, A. y cols., 1998).

El porcentaje de resistencia a penicilina (intermedia y alta) ha aumentado en las dos últimas décadas desde aproximadamente un 6% (Fenoll, A. y cols., 1991) a porcentajes cercanos al 60-65% (Baquero, F. y cols., 1999 a). En nuestro estudio, se han observado estos mismos valores, así como en otros estudios comunitarios realizados en Madrid durante los mismos años 1999 y 2000 (Oteo, J. y cols., 2001 a), aunque en este estudio la resistencia total ha sido más alta (40,6%); estos porcentajes manifiestan que solamente una tercera parte de los aislados son sensibles a penicilina.

No obstante, hay que resaltar que en estudios de los últimos años se ha observado un descenso de esta elevada resistencia a penicilina (Pérez-Trallero, E., y cols., 2005; Picazo, J.J. y cols. 2006). Concretamente se han obtenido porcentajes de resistencia del 20% para penicilina en los últimos trabajos de vigilancia epidemiológica (Pérez-Trallero, E., y cols., 2005). Este descenso podría ser debido al menor consumo de antibióticos en la población, ya que diversos estudios han demostrado que existe una relación directa entre el aumento de resistencias y el consumo de antibióticos (Bronzwaer, S., y cols., 2002).

La incidencia de neumococos resistentes a la penicilina en nuestro país durante los años del estudio fue de las más elevadas (Baquero, F. y cols., 1999 a), pues las tasas de alta resistencia se encuentran alrededor del 30% (Pallarés, R. y cols., 1999), dependiendo en gran medida de la localización geográfica. En nuestro estudio, como en otros, hemos encontrado variaciones significativas de los patrones de resistencia entre las distintas regiones (Fenoll, A. y cols., 1998): la incidencia de cepas resistentes es mayor en Sevilla, Madrid, Salamanca y Granada, con porcentajes alrededor del 40%, a diferencia de otras zonas del país.

Estos porcentajes de resistencia son algo más elevados que los hallados en otro estudio en el que los porcentajes de resistencia están en torno al 30-35% (Marco, F. y cols., 2000), pero hay que destacar que el número de cepas con que se ha trabajado es menor, aún siendo las mismas ciudades y mismos hospitales que los de nuestro estudio, y que el estudio se ha llevado a cabo algunos años más tarde, cuando se ha ido observando un descenso en la resistencia.

Sin embargo, no se observaron cepas resistentes a penicilina en el hospital de La Coruña (0%). Este hecho ya ha sido mostrado por otros autores, que muestran muy baja resistencia a la penicilina con respecto a otros centros hospitalarios estudiados (Marco, F. y cols., 2000).

Todos estos altos niveles en las tasas de resistencia en las diversas regiones contribuyen a la resistencia general en nuestro país, dando una idea de cómo es la situación del *S. pneumoniae* en España, donde en los últimos diez años ha variado aproximadamente desde un 6% (Baquero, F. y cols., 1999 a) a porcentajes del 30% a 40% a principios del siglo XXI (Liñares, J. y cols., 1992; Oteo, J. y cols., 2001 b). Estos niveles también se puede observar en nuestro estudio, en el que los aislados estudiados también fueron recogidos durante esos mismos años, donde los

porcentajes de resistencia obtenidos son similares, concretamente con un 32,11% para la penicilina.

Sin embargo, los porcentajes de resistencia más bajos en nuestro estudio los muestra amoxicilina (con o sin ácido clavulánico), con tasas similares a las obtenidas en otro estudio llevado a cabo en el mismo año (Pérez-Trallero, E., 2000), debido principalmente al cambio de los puntos de corte por el NCCLS en 1999, que considera resistentes el valor de ≥ 8 mg/l en lugar del valor anteriormente utilizado, que era ≥ 4 mg/l, con lo cual hubiéramos obtenido unos porcentajes similares a los mostrados para la penicilina.

Es posible que cuando las CMI de la penicilina frente a *S. pneumoniae* son elevadas también estén aumentadas, aunque en grado diferente, las de otros betalactámicos (Liñares, J. y cols., 1992 b; Pankuch, GA. y cols., 1995). Entre las cefalosporinas orales, la cefpodoxima y la cefuroxima son las únicas que mantienen los valores de CMI relativamente bajos con respecto a las demás para este patógeno. Sin embargo, los valores de CMI₉₀ de estos agentes son equitativos a los obtenidos por cefpodoxima (4 mg/l) y no muy diferentes de los de otras cefalosporinas, tales como cefuroxima o ceftibuteno (8 mg/l).

Los porcentajes de resistencia de cefpodoxima y cefuroxima que fueron las cefalosporinas más activas, presentaron unos valores alrededor del 32 y 34% respectivamente, siendo porcentajes equivalentes a los obtenidos para la penicilina. De este modo, podríamos establecer una escala en la actividad de agentes betalactámicos orales en términos de tasas de resistencia, con agentes antimicrobianos como amoxicilina (con o sin ácido clavulánico) siendo más activos que la penicilina; cefpodoxima y cefuroxima (y en menor grado ceftibuteno y cefixima) con porcentajes similares a penicilina; y cefaclor con altos porcentajes de resistencia (dos veces los valores de penicilina).

Otro problema es la resistencia que presentan estos microorganismos frente a los macrólidos. Se ha obtenido un porcentaje de resistencia del 24,41% para la azitromicina, siendo este valor más bajo que el mostrado en otros estudios durante esos mismos años (Felmingham, D. y cols., 2000; Baquero, F. y cols., 1999; Oteo, J. y cols. 2001 b), en los que se ha observado, valores del 30% al 35% de resistencia para eritromicina o azitromicina en el periodo 1996-2000. En la actualidad estos niveles de resistencia se mantienen más o menos constantes en estos años, ya que los últimos porcentajes de resistencia obtenidos en los últimos estudios de vigilancia epidemiológica llevados a cabo en España están en 34,5% para ambos macrólidos (Pérez-Trallero, E., y cols., 2005).

Es interesante resaltar en nuestro estudio, al igual que en otros (Felmingham, D. y cols., 2000; Baquero, F. y cols., 1999), que la resistencia a macrólidos es más elevada dentro de los aislados resistentes a penicilina, solamente un 5,36% de cepas sensibles a penicilina fueron resistentes a macrólidos, mientras que para los aislados resistentes a penicilina la proporción fue del 55,21%, al igual que en otros estudios (Felmingham, D. y cols.; 2000; Liñares, J. y cols., 1992; Barry, AL. y cols., 1996; Thornsberry, C. y cols., 1999). Este cruce de resistencias ha sido estudiado y puede ser debido a una justificación epidemiológica (diseminación conjunta por clones epidémicos), ya que los mecanismos de acción de ambas, penicilinas y macrólidos son diferentes (Granizo, JJ. y cols., 2000; Thornsberry, C. y cols., 1999).

Por otro lado, el porcentaje de resistencia de *H. influenzae* a penicilina o aminopenicilinas (ampicilina) se ha incrementado durante las dos últimas décadas (Felmingham, D. y cols., 2000). En varios países, incluido España, el porcentaje de aislados betalactamasa-positivo es superior al 30% (Felmingham, D. y cols., 2000; Tornsberry, C. y cols., 1999 a), aunque estos porcentajes no han cambiado

significativamente en los últimos años. Hemos encontrado un porcentaje total de aproximadamente un 26% de estas cepas, aunque lo más interesante es destacar la disminución de este porcentaje en el año 2000, en el cual las cepas betalactamasas positivas descendieron a un 22,88% siendo en años anteriores cercanos al 30,21%. En 1998-99, Bandak y cols. (Bandak, Sl. y cols., 2001) mostraron en nuestro país un 21,80% de aislados betalactamasa-positivos. En 1996-97, otros autores encontraron también en España porcentajes de un 25,7% a un 31,7% (Felmingham, D. y cols., 2000; García-Rodríguez, JA. y cols., 1999), valores no muy diferentes a los encontrados en nuestro estudio en 1999, y similares al 30% y 33,3% presentados en Barcelona y Madrid respectivamente, en un estudio de vigilancia epidemiológica durante 1992-93 (Tornsberry, C. y cols., 1996). Estos resultados parecen indicar que hay un estancamiento del porcentaje de aislados ampicilina-resistentes en nuestro país al igual que en otros. En un estudio reciente en España (Picazo, JJ. y cols., 2006) observa que se mantienen los niveles de *H. influenzae* resistente a ampicilina (23,6%).

En términos de actividad antimicrobiana, las cefalosporinas no están afectadas por las betalactamasas producidas por estos microorganismos, mostrando menores valores de CMI₉₀. Cefixima, cefpodoxima y ceftibuteno mostraron los valores más bajos (0,125-0,25 mg/l), mientras que la combinación amoxicilina/ácido clavulánico y cefuroxima fueron menos activas (1-2 mg/l). Sin embargo no fueron observadas cepas resistentes con ningún antimicrobiano excepto penicilina, amoxicilina y cefaclor, que mostraron un pequeño porcentaje de resistencia (94,74% cepas sensibles). Azitromicina (CMI₉₀ = 0,25 mg/l) fue tan activa como las cefalosporinas cefixima, cefpodoxima o ceftibuteno, siendo una posible alternativa en el tratamiento de las infecciones causadas por estos patógenos. No se observaron diferencias en la sensibilidad entre los hospitales que participaron en nuestro estudio.

Sin embargo, otro problema que requiere nuestra atención sería evitar las consecuencias del aumento de las resistencias, debidas a las cepas resistentes a la ampicilina no productoras de betalactamasas. Las tasas de este tipo de resistencia, probablemente producida por alteraciones en las PBPs (Barry, AL. y cols., 2001; Doern, GV. y cols., 1996).

En nuestro estudio este descenso traducido en porcentaje sería solamente un 1,66%, muy similar al 1,8% encontrado en 1996 en Barcelona (Felmingham, D. y cols., 2000) y más bajo que el 4,6% observado en otro estudio multicéntrico español realizado en 1996-97 (García-Rodríguez, JA. y cols., 1999), pero todos nuestros aislados conservaron buena sensibilidad a las cefalosporinas (a excepción de cefaclor) y azitromicina. En estudios más recientes los porcentajes de resistencia a ampicilina muestran un 4,4% (Pérez-Trallero, E., y cols., 2005).

Como ya se ha comentado anteriormente, no se ha descrito ninguna cepa de *S. pyogenes* resistente a penicilina (Kaplan, EL. y cols. 1997), sin embargo la prevalencia de resistencia a macrólidos ha presentado incrementos de resistencia en determinadas zonas con porcentajes cercanos al 30% (Pérez-Trallero, E., y cols., 1998) con amplias variaciones (Alós, JI, y cols., 2003). En nuestro estudio *S. pyogenes*, mostró una buena actividad para todos los agentes betalactámicos, y no fueron encontradas cepas resistentes con ninguno de estos agentes. En términos de valores de CMI, penicilina y amoxicilina (con o sin ácido clavulánico) mostraron los menores valores, concretamente presentaron unos valores de CMI₉₀ de 0,06 mg/l.

Entre las cefalosporinas, cefpodoxima y cefuroxima fueron más activas que el resto (cefixima, cefaclor y ceftibuteno). Estos resultados también se han observado en trabajos llevados a cabo por otros autores durante el mismo periodo que nuestro estudio con estos patógenos (Baquero, F. y cols., 1999 b), con la diferencia en los

valores obtenidos de CMI₉₀ que fueron solamente un poco más elevados para cefaclor (≤ 1 mg/l frente 2 mg/l en nuestro estudio).

Los macrólidos sin embargo mostraron un 20% de resistencia (resistencia intermedia y alta con azitromicina). Aquí nuestros porcentajes de cepas resistentes son más bajos que en otros estudios que presentan porcentajes de resistencia a azitromicina (27,1%) y a eritromicina (23,5%) (Alós, JI. y cols., 2000; Baquero, F. y cols., 1999 b).

Finalmente, *M. catarrhalis* muestra en nuestro estudio valores a los antimicrobianos estudiados muy similares a los obtenidos en otros estudios (Felmingham, D. y cols., 2000; Bandak, SI. y cols., 2001). Esto es debido a que el único mecanismo de resistencia que presenta este patógeno en la actualidad es la producción de betalactamasas. Los agentes antimicrobianos más activos fueron azitromicina y amoxicilina/ácido clavulánico, que presentan valores de CMI₉₀ de 0,06 y 0,5 mg/l respectivamente. Sin embargo, cefixima (y en menor grado cefpodoxima) conservó una aceptable actividad frente a estos microorganismos, con valores de CMI₉₀ ≤ 2 mg/l.

Con este trabajo demostramos la importancia de la distribución geográfica, por lo que resulta útil conocer los patrones de uso de antimicrobianos en cada zona geográfica para así elaborar una actitud local de prescripción de antibióticos, dirigida a prevenir la aparición de resistencias (Cantón, R., y cols., 1999).

Existen varios factores que se asocian al nivel y desarrollo de resistencia antibiótica en una zona determinada. Uno de los factores que puede influir es el consumo de antibióticos (Möslstad, S., y cols., 2002), aunque no todas las familias de antimicrobianos tienen la misma capacidad de selección de resistencia, e incluso dentro de una misma familia hay antibióticos que son más selectores que otros

(Aguilar, L. y cols., 2002). Sin embargo, no se trata de un factor exclusivo ya que pueden implicarse otros mecanismos como son la distribución de serotipos (serotipos virulentos suelen ser resistentes) en dicha zona y la diseminación de clones resistentes. La asociación de estos tres factores probablemente influye de manera determinante en el aumento de cepas resistentes a los antibióticos de uso común y también en el porcentaje de los aislados multirresistentes. Por lo tanto, en los últimos años uno de los objetivos prioritarios es la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas y preventivas.

2. Caracterización molecular de cepas *S. pneumoniae* resistentes a amoxicilina.

Las técnicas de epidemiología molecular permiten conocer las características genéticas de las bacterias que no permiten otras técnicas de laboratorio convencionales. Mediante esta disciplina se ha proporcionado una nueva visión de las características biológicas de *S. pneumoniae*. Por todo ello, y utilizando las ventajas de esta técnica de tipado molecular, se decidió estudiar genéticamente los clones resistentes que circulan en España. Para este estudio se seleccionaron distintos aislados de *S. pneumoniae* con sensibilidad disminuida frente a amoxicilina que presentasen diferentes valores de CMI (4, 8 y 16 mg/l).

Los diferentes estudios de resistencia a nivel internacional indican que la resistencia a penicilina ha surgido simultáneamente en regiones geográficas distantes. Los estudios de epidemiología molecular demuestran que efectivamente la resistencia mostrada por *S. pneumoniae* es resultado de eventos independientes entre sí, que involucran cepas de diversos serotipos y linajes genéticos.

No obstante, casi todos los serotipos pueden adquirir resistencia frente a penicilina (Baquero, F. y cols., 1991), pero en general se ha aceptado que la resistencia a penicilina se encuentra asociada a determinados serogrupos o serotipos (Liñares, J. y cols., 1992). Por ello, a pesar de la elevada diversidad de serotipos neumocócicos que existen, tan sólo 16 de los 90 serotipos descritos causan más del 90% de las enfermedades invasivas (Feldman, C. y Klugman, KP., 1997), existiendo variación en el orden que ocupan, según su prevalencia y las distintas áreas geográficas (Hausdorff, WP. y cols., 2000).

Ante esta amplia diversidad de serotipos, destacan claramente algunos clones que alcanzaron rápidamente una difusión intercontinental, como el clon Spain^{23F}-1,

altamente resistente a los betalactámicos y otros antibióticos, que se diseminó ampliamente a otros países, o incluso el clon Spain^{6B}-2, también de origen español, que produjo un aumento considerable de la resistencia a penicilina en Islandia (Muñoz, R. y cols., 1991), Grecia y Francia (Syrogiannopoulos, GA. y cols., 2001).

En nuestro estudio, los neumococos con sensibilidad disminuida frente a amoxicilina mostraron esta diversidad genética. Así fueron identificados 10 patrones diferentes dentro los 51 neumococos estudiados, dentro de los cuales estaban incluidos 4 clones ampliamente extendidos internacionalmente (France^{9V}-3, Spain¹⁴-5, Spain^{23F}-1 y Spain^{6B}-2). Concretamente según la figura 7, los clones mayoritarios fueron el France^{9V}-3 con un porcentaje del 48% y el Spain^{23F}-1 del 20%, luego siguen el Spain¹⁴-5 (12%) y el Spain^{6B}-2 (8%), el resto de clones (n=6) se presentaron una sola vez.

Es de especial interés, concretamente en el caso del neumococo, la identificación de clones asociados con la resistencia a los diferentes antibióticos. De hecho la asociación de determinados clones con la resistencia, tanto elevada como intermedia a penicilina, ha sido estudiada por diferentes autores (MCGee, L. y cols., 2001; Klugman, KP., 2002). En nuestro trabajo las cepas se seleccionaron en base a la sensibilidad que presentaban frente a amoxicilina, antibiótico mayormente utilizado frente las infecciones respiratorias en Atención Primaria de Salud, de modo que los aislados presentaban dos grados de resistencia frente a la misma: aislados resistentes (CMI \geq 8 mg/l) y aislados de resistencia intermedia (CMI = 4 mg/l). Del total de las cepas resistentes (n=51), el 23,5% (n=12) presentaban resistencia intermedia frente a amoxicilina, y de las cepas con alta resistencia (76,3%), sólo el 5,8% presentaron un valor de CMI = 16 mg/l.

Existen numerosos trabajos que observan que los clones de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina han emergido de un número limitado de serotipos, que son 6B,

9V y 23F (Muñoz, R. y cols., 1991; Soares, S. y cols., 1993; Hermans, PWM. y cols., 1997). Estos serotipos coinciden con los aislados observados de nuestro estudio con sensibilidad disminuida frente a amoxicilina de nuestro estudio: 9V (39,2%), 23F (19,6%) y 6B (11,7%). Además en nuestro estudio el segundo más prevalente fue el serotipo 14 (27,4%), que aunque no es uno de los clones iniciales de diseminación de resistencia a penicilina, si que es uno de los serotipos asociados a la misma.

El serotipo juega un papel en la virulencia, lo que pasa es que los menos virulentos suelen ser resistentes. Es importante resaltar que hemos observado que los clones que presentan alta resistencia ($\text{CMI} \geq 8 \text{ mg/l}$) a amoxicilina coinciden con algunos de los clones internacionales multirresistentes a penicilina ampliamente extendidos, como son los clones France^{9V}-3, Spain¹⁴-5, Spain^{23F}-1 e incluso el Spain^{6B}-2 (Fenoll, A. y cols., 2002). En nuestro trabajo el clon mayoritario obtenido en los aislados de resistentes a amoxicilina fue el clon France^{9V}-3 (46%), seguido del Spain^{23F}-1 (23%), Spain¹⁴-5 (12%) y Spain^{6B}-2 (8%).

Existen pocos datos de clones y resistencia a amoxicilina debido a los pocos aislados de *S. pneumoniae* resistentes a amoxicilina. En España, un estudio observó la presencia del clon Spain¹⁴-5, aislado de 16 pacientes, con resistente a amoxicilina y a otros antimicrobianos (Pérez-Trallero, E. y cols., 2003). Sin embargo, en otro estudio en EEUU los aislados resistentes a amoxicilina presentaban clones únicos (Kosowska, K., y cols., 2004), en el que aunque 15 aislados compartían la misma PBP2b alterada, no pertenecían a los mismos clones, sino a 14 clones únicos, que pertenecían a 5 serotipos (6B, 14, 19A, 19F y 23 F), así como también presentaban sensibilidad variable a macrólidos, clindamicina y tetraciclinas.

Esto sugiere que la alta prevalencia de estos clones entre las cepas resistentes a amoxicilina viene reflejada por su alta prevalencia en la población, y corrobora que

los aislados resistentes a amoxicilina están siendo seleccionados a partir de los clones existentes, todo esto favorecido por el alto consumo de amoxicilina en España. Existen datos que indican que estos clones son muy frecuentes entre los neumococos que colonizan la nasofaringe en los niños (Sa-Leao, R. y cols., 2000) y también entre los que causan enfermedades neumocócias (Enright, MC., y cols., 1999) en adultos como en niños.

Esta asociación de la resistencia a amoxicilina con estos clones epidémicos internacionales podría garantizar la rápida diseminación geográfica de la resistencia a otros antibióticos.

Respecto al serotipo y clones de PFGE se han llevado a cabo estudios que defienden que tanto las propiedades asociadas con un tipo clonal particular, como el serotipo capsular en sí mismo, son igualmente importantes para el desarrollo de la enfermedad (Sandgren, A. y cols., 2004). Creemos que los resultados obtenidos (tabla 10) apoyan la hipótesis de una diversidad patógena dentro de cada serotipo, se han identificado algunos aislados que a pesar de presentar el mismo serotipo, expresan diferentes tipo clonales, definidos por PFGE, como es el caso de algunos aislados con serotipo 14 que presentan clones Spain¹⁴-5, France^{9V}-3 (como es caso de las cepas N-1632, N-155 y N-152), y Spain^{23F}-1 (cepa N-1496), y aislados con serotipo 23F, presentan clones Spain^{23F}-1y France^{9V}-3 (cepas N-902, N-2452 y N-2652). Estos aislados son el resultado de una cambio capsular “capsular switch” *in vivo* a través de mecanismos de transformación o transducción con ADN extraño (Coffey, TJ. y cols., 1998; Nesin, M. y cols., 1998; Ramírez, M. y Tomasz, A. 1999).

El neumococo es un microorganismo naturalmente competente para la transformación genética. Con este mecanismo incorpora ADN externo en su cromosoma bacteriano mediante fenómenos de recombinación. El hecho de su

presencia en la microbiota nasofaríngea junto a otras numerosas especies bacterianas de individuos portadores, le proporciona un nicho ecológico idóneo para este intercambio genético. De esta manera, a través de genes o segmentos de genes derivados de la misma especie o de otros estreptococos (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y otros *Streptococcus viridans*) y otros géneros, o por incorporación de elementos móviles como son los transposones, o incluso, en menor medida por mutaciones, puede adquirir elementos que le proporcionan propiedades que le permiten evadir la respuesta inmunológica del huésped o bien, presentar resistencia a un tratamiento antimicrobiano.

En el neumococo, una de las consecuencias más importantes del intercambio de polisacárido capsular es su implicación en el desarrollo de vacunas conjugadas. En nuestro estudio hemos visto que los serotipos resistentes a amoxicilina coinciden con los serotipos incluidos en la vacuna actual. No obstante, estas vacunas presentan un número limitado de serotipos que podrían ser eficaces durante un periodo tiempo, pero tendríamos que tener en cuenta que aquellos individuos vacunados pueden ser infectados por otros aislados que hubieran cambiado a otros serotipos no incluidos en la vacuna por intercambio de material genético conservando de este modo su virulencia.

Los resultados de nuestro estudio podrían cambiar en los próximos años debido a la introducción de la vacuna y los cambios que se están observando a nivel de serotipos (Barricarte, A., y cols., 2007). Recientemente, se ha descrito el aumento de un serotipo no incluido en la vacuna (serotipo 19A) que es resistente a amoxicilina. (Pichichero, ME. y Casey, JR., 2007).

La aparición de estas variantes no está del todo clara, aunque ya se han en notificado en nuestro país existen estudios que muestran que hay un incremento de aquellos serotipos que no están incluidos en la vacuna (Barricarte, A., y cols., 2007). Se

podría parar a pensar que ésto conllevara a un aumento de la incidencia de serotipos no incluidos en la vacuna. Por lo tanto, nos reitera la importancia de mantener estudios de vigilancia epidemiológica de la distribución y diseminación de los serotipos vacunales, como aquellos no incluidos en la vacuna, así como de sus sensibilidades a antibióticos, con el fin de evitar la posible diseminación de los serotipos y clones resistentes.

3. Estudios PK/PD de amoxicilina SR 2000 mg y amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg

La erradicación bacteriana es una estrategia que pretende optimizar el tratamiento de las infecciones minimizando los riesgos de selección, propagación y diseminación de las cepas resistentes. Los modelos dinámicos *in vitro* son herramientas usadas para evaluar la cinética de letalidad de los agentes antimicrobianos bajo unas condiciones controladas, que permiten simular los parámetros farmacodinámicos en el ser humano. Se han desarrollado nuevos modelos en los cuales con el control de la computerización de bombas peristálticas permiten la simulación de perfiles farmacocinéticos multiexponenciales y el uso de una jeringa controlada por una bomba, que permite simular la administración oral y la infusión intravenosa.

Los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos pueden ayudar a predecir la capacidad de erradicación de cada agente antimicrobiano, o lo que es lo mismo se pueden utilizar para predecir la eficacia clínica (Dagan, R., y cols., 2001; Ball, P. y cols., 2002). Con los parámetros farmacocinéticos podemos utilizar concentraciones de antibiótico que busquemos, que junto con los parámetros microbiológicos (CMI), daría lugar a los parámetros farmacodinámicos que nos indicarán cómo funciona el antibiótico.

S. pneumoniae es el agente etiológico más frecuente en las infecciones del tracto respiratorio (Doern, GV., 2001), y junto con el aumento de la prevalencia de cepas de neumococo multirresistentes, ha complicado el tratamiento empírico de las infecciones respiratorias (Van Kerkhoven, D., y cols, 2003). Esto implica la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas que contribuyan a disminuir la probabilidad de

selección y diseminación de estas cepas resistentes (Aguado, JM. y Martín-Herrero, JE. 2004).

En nuestro estudio utilizamos amoxicilina, ya que generalmente es un excelente antibiótico para el tratamiento de muchas infecciones respiratorias producidas por *S. pneumoniae*. Este fármaco alcanza unos parámetros farmacocinéticos bastante favorables para erradicar microorganismos “sensibles” a las dosis habitualmente utilizadas y recomendadas (500 mg y 875 mg/8 h) en el adulto por vía oral. La utilización de dosis más elevadas (1g/8 h) de amoxicilina favorece su farmacocinética, pero hay que decir que los índices farmacodinámicos básicamente no mejoran debido a su corta vida media en humanos, que es aproximadamente de 1 hora. No obstante, estas dosis pueden alcanzar unos parámetros farmacocinéticos suficientes para eliminar los aislados de *S. pneumoniae* con CMI a amoxicilina $\leq 1\text{mg/l}$, siempre y cuando el foco infeccioso se encuentre en un lugar accesible.

Como la amoxicilina es un antibiótico con acción bactericida tiempo-dependiente (Soriano, F., 2006 a), se pueden mejorar sus índices farmacodinámicos aumentando la frecuencia de la administración del antibiótico. El $T > \text{CMI}$ es el parámetro que mejor predice la magnitud de la muerte bacteriana y por consiguiente la eficacia clínica de esta clase de antimicrobianos. Por lo tanto, la administración de amoxicilina en dosis elevadas y con mayor frecuencia permitiría eliminar los aislados *S. pneumoniae* que presenten CMIs más elevadas.

Sin embargo hay que decir que la administración muy frecuente de fármacos se desaconseja por su gran incomodidad y dificultad para el paciente en su cumplimentación. Todo esto llevó al planteamiento de la administración de antibióticos que al mejorar su farmacocinética alcancen una mayor actividad frente a los microorganismos que presenten CMIs más elevadas, pero también permitan una administración más cómoda. En base a todas estas premisas, se diseñó una nueva

formulación oral de amoxicilina/ácido clavulánico de “liberación sostenida” (2000/125 g/12 h), para aumentar y mantener las concentraciones séricas en el tiempo (Kaye, CM. y cols., 2001). Este perfil farmacocinético mejorado permite que la concentración plasmática de amoxicilina/ácido clavulánico exceda de 4 mg/l y 8 mg/l durante el 49% y el 35% del intervalo posológico respectivamente (Kaye, CM. y cols., 2001).

En la infección neumocócica el ácido clavulánico no interviene en el tratamiento, pero es un compuesto que puede ser de utilidad cuando la infección está producida por otros microorganismos resistentes a amoxicilina pero sensibles a la asociación. De todas maneras parece ser que el ácido clavulánico tiene afinidad por unirse a la PBP3, proteína que interviene en la formación de la pared celular del neumococo. Esta interacción no se debe a la inhibición de las betalactamasas ya que el neumococo no las produce, pero la pared celular bacteriana queda alterada en las cepas resistentes y la bacteria se hace más sensible a la acción del ácido clavulánico (Severin, A., y cols, 1997).

Aunque la asociación amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg ha mostrado una buena eficacia clínica en estudios sobre neumonía adquirida en comunidad (Garau, J. y cols., 2003), hay que resaltar que en dichos trabajos había sólo un pequeño número de pacientes con infecciones neumocócicas por aislados que presentaban valores altos de CMI frente a amoxicilina. Puesto que es importante estudiar situaciones en las que los datos clínicos no puedan proveer una respuesta adecuada y dado que la probabilidad de que los agentes patógenos con un perfil de sensibilidad disminuida es bastante baja (Croisier, D. y cols., 2002), fue el motivo de que se llevara a cabo la simulación farmacodinámica con aislados *S. pneumoniae* con sensibilidad disminuida frente a amoxicilina, concretamente con aquellos que presentaban valores de CMI comprendidos entre 4 y 9 mg/l (diluciones de 1mg/l, tabla 16).

Elegimos un enfoque farmacocinético/farmacodinámico basado en curvas de letalidad puesto que éste es el acercamiento más razonado para describir las interacciones entre los antibióticos y las bacterias, que el clásico acercamiento con los estudios de sensibilidad de la CMI o incluso CMB a las 24h (Mueller, M. y cols., 2004).

Se realizaron los estudios farmacodinámicos con Todd-Hewit por su comodidad en la elaboración y la no saturación de los filtros respecto al Mueller-Hinton con 5% de sangre. Las CMI de los aislados fueron similares en ambos medios.

En nuestro trabajo simulamos los perfiles farmacocinéticos de las concentraciones séricas de amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg y amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg que como se puede ver en los ensayos microbiológicos (figura 21), los parámetros se situaron en el rango obtenido en humanos (Kaye, CM., 2001) y otras simulaciones farmacodinámicas (Löwdin, E., 2002)

La actividad bactericida de un antibiótico es importante para la erradicación de los patógenos e imprescindible para evitar el desarrollo de resistencias. Se evaluaron las reducciones del inóculo inicial (reducción de la masa bacteriana) a lo largo del tiempo. Tras 24 horas de tratamiento, amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg dos veces al día demostró ser bactericida, con más de 3 Log de reducción ($\geq 99,99\%$) sobre los aislados de CMI 4 mg/l (cuyas CMBs estaban comprendidas en el rango de 4 a 7 mg/l), una reducción del 98,95-99,94% para cinco de los aislados con CMI 8 mg/l (cuyas CMBs estaban comprendidas en el rango de 7 a 9 mg/l), y una reducción del 70,64% para los aislados con CMI de 16 mg/l (con una CMI y CMB de 9 mg/l). Estos resultados son similares a los de otros estudios (MacGowan, AP., 2004).

Este no fue el caso con amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg, donde tras 24 horas de tratamiento la reducción del inóculo se obtuvo en dos de los cuatro aislados con CMI 4 mg/l, en tres de los cinco aislados con CMI de 8 mg/l y en una de los aislados de CMI 16 mg/l. Cinco de las 10 cepas no mostraron ninguna reducción

del inóculo inicial a las 24 h con la formulación de amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg. Esta ausencia de reducción del inóculo con esta formulación, al igual que en otros trabajos (MacGowan, AP., 2004), ocurre con los aislados que presentan resistencia intermedia frente a amoxicilina (CMI = 4 mg/l).

El 70% de los aislados clínicos de neumococos resistentes a la penicilina muestran una lisis defectuosa, siendo la prevalencia de la tolerancia mucho más alta que en las cepas sensibles a penicilina (Azoulay-Dupuis, E. y cols., 1996; Moreillon, P. y Tomasz, A., 1998). Los rasgos de tolerancia son independientes de las alteraciones en las PBP, y la tolerancia a un antibiótico específico se atribuye a cambios de la actividad autolisina más que a la supervivencia después de dosis bactericidas (Azoulay-Dupuis, E. y cols., 1996).

Como ya hemos comentado anteriormente, cinco de las diez cepas no mostraron ninguna reducción del inóculo inicial a las 24 h con la formulación de amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg. La subpoblación superviviente mostró una CMI similar a la simulación previa y puede ser considerada tolerante a la formulación de amoxicilina 875/125 mg después de la tercera dosis. Este comportamiento tolerante observado en la simulación con amoxicilina 875 mg no fue observado en la simulación con amoxicilina 2000 mg, probablemente debido al hecho de que posee un perfil farmacocinético mas elevado que dio como resultado un $T > CMI$ incrementado.

Respecto a la correlación entre los índices farmacodinámicos, en particular $T > CMI$, y la eficacia de amoxicilina/ácido clavulánico, nuestros resultados ($T > CMI$: 46-63%) demuestran, como en otros estudios (Kaye, CM., y cols., 2001), que existe una buena correlación entre dicho índice y la eficacia terapéutica del antibiótico.

También se ha observado un recrecimiento con la formulación amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg que puede ser atribuido a un insuficiente $T > CMI$, ya que al finalizar el tiempo de administración los aislados mostraron

sensibilidades idénticas a las iniciales (Tabla 20). Otra posible explicación de estos recrecimientos sería la que algunas de las cepas estudiadas fueran tolerantes a amoxicilina.

En consecuencia, basándonos en el perfil farmacodinámico de la amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg cada 12 h es previsible que erradique los aislados con una CMI de amoxicilina de ≤ 4 mg/l, pudiendo incluso tener actividad frente a aislados con CMI de 8 mg/l. En comparación, amoxicilina/ácido clavulánico 875/125 mg cada 8 h alcanza concentraciones plasmáticas de 2 mg/l durante aproximadamente el 40% del intervalo posológico y sólo erradicará del foco infeccioso, las cepas con una CMI de amoxicilina ≤ 2 mg/l (Drusano, GL. y Craig, WA., 1997; Martín-Herrero, JE., y cols., 2003).

Considerando todos estos resultados, la nueva formulación amoxicilina/ácido clavulánico 2000/125 mg tiene mejor actividad frente a las cepas con sensibilidad disminuida frente a la amoxicilina que la formulación de 875/125 mg. Esta mejor cobertura sobre cepas con mayor CMI puede ser útil en hospitales/centros/regiones/países con altos % de cepas resistentes a amoxicilina

Se podría concretar en que los datos locales de resistencia, junto con la utilización de los parámetros farmacodinámicos podrían ser las bases sobre las que se deberían apoyar las recomendaciones terapéuticas (Dagan, R., 2001), contribuyendo en temas de educación sanitaria,

Conclusiones

1.- La diferente distribución de la resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina en las diferentes áreas geográficas hace imprescindible la implantación de estudios multicéntricos periódicos.

2.- Las cefalosporinas constituyen una excelente alternativa al tratamiento convencional de aminopenicilinas en el manejo de infecciones respiratorias en la comunidad:

- Las cefalosporinas más activas frente al *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina fueron cefpodoxima y cefuroxima seguidos de cefixima y ceftibuteno.
- Frente a *Streptococcus pyogenes* cefpodoxima y cefuroxima fueron las más activas, después de las aminopenicilinas.
- Las cefalosporinas destacan por su buena actividad frente a *Haemophilus influenzae* así como azitromicina.
- Entre las cefalosporinas la mayor actividad frente a *Moraxella catarrhalis* se alcanzó con cefixima.

3.- El alto nivel de resistencia a amoxicilina está emergiendo de los clones resistentes a penicilina preexistentes lo que obliga al seguimiento de la evolución de las cepas.

4.- El clon Spain^{9v}-3 fue el más prevalente con el 46% de todos los aislados resistentes a amoxicilina.

5.- El impacto que la vacunación está teniendo en la evolución de la infección causada por *Streptococcus pneumoniae* y la futura prevalencia de las resistencias, puede verse reflejado en el comportamiento de los serotipos de *S. pneumoniae* resistentes a amoxicilina.

6.- La formulación de liberación sostenida permite alcanzar un mayor tiempo de exposición sobre la CMI, presenta mayor actividad a lo largo de 24 h de tratamiento y menor tiempo en alcanzar la actividad bactericida, por lo que se recomienda amoxicilina 2000/125 mg frente a 875/125 mg, ya que además puede obtener mejores resultados frente a *Streptococcus pneumoniae* resistentes a amoxicilina.

7.- El estudio de los parámetros farmacodinámicos a través de la simulación permite, en el caso de los betalactámicos, valorar la eficacia del tratamiento pudiendo predecir la erradicación bacteriana o el fracaso terapéutico. Este tipo de estudios indicarán el cambio de estrategias de dosificación de los antimicrobianos.

8.- La repercusión de los datos concernientes al uso prudente de antibióticos, y más concretamente a la utilización de datos locales de resistencias y así como la adecuación de las dosis contribuirán a introducir este tipo de temas en educación sanitaria para las campañas del uso responsable de antibióticos.

Bibliografía

- Aaberge, IS., Lovik, M. The antibody response after immunization with pneumococcal polysaccharide vaccine in splenectomized mice: the effect of reimmunization with pneumococcal antigens. *APMIS*. 1996. 104: 307-317.
- Aguado, JM., Martín-Herrero, JE. Nuevas perspectivas en el tratamiento de la infección respiratoria comunitaria: amoxicilina-ácido clavulánico 2000/125 mg de liberación prolongada. *Med Clin Monogr (Barc)* 2004. 5(3): 46-51.
- Aguilar, L., Giménez, MJ., García-Rey, C., Martín, JE. Strategies to overcome antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* with β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob Chemother* 2002; 50 (suppl S2): 93-100.
- Alonso de Velasco, E., Verheul, AF., Verhoef, J., Snippe, H. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis and vaccines. *Microbiol. Rev.* 1995; 59: 591-603.
- Alós, JI., Aracil, b., Oteo, J., Gómez-Garcés, JL. Significant increase in the prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin- and miocamycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes* in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51: 333-337.
- Alós, JI., Aracil, B., Oteo, J., Torres, C. and Gómez-Garcés, JL. High prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin/miocamycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes*: results of a Spanish multicentre study in 1998. Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting. *J Antimicrob Chemother.* 2000.45: 605-609.
- Andrews JM, White LO. B-Lactams. En: Reeves BS, Wise R, Andrews JM, White LO (eds.). *Clinical antimicrobial assays*. Oxford University Press, New York. 1999; 93–122.
- Appelbaum, P.C. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin. Infect. Dis.* 1992. 15:77-83.
- Appelbaum, PC. Microbiological and pharmacodynamic considerations in the treatment of infection due to antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae*. 2000. *Clin Infect Dis.* 2000; 31 Suppl 2: S29-34.

- Aracil, C., Gómez-Garcés, J.L., Alós, J.I. y Grupo de Estudio de Infección en Atención Primaria de la SEIMC (IAP-SEIMC). Sensibilidad de *Haemophilus influenzae* aislados en España a 17 antimicrobianos de administración oral. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21: 131-136.
- Austrian, R. *Pneumococcus*: the first one hundred years. *Rev Infect Dis*. 1981. 3: 183-189.
- Austrian, R. The Quellung reaction, a neglected microbiologic technique. *Mt Sinai J Med*. 1976. 43(6): 699-709.
- Austrian, R., Gold, J. Pneumococcal bacteremia with special reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Ann Med*. 1964. 60: 759-776.
- Avanzini, M.A., Carra, A.M., Maccario, R., Zecca, M., Pignatti, P., Marconi, M., Comoli, P., Bonetti, F., De Stefano, P., Locatelli, F. Antibody response to pneumococcal vaccine in children receiving bone marrow transplantation. *J Clin Immunol*. 1995. 15(3): 137-44.
- Avery, O.T., Goebel, W.F. Chemo-immunological studies of the soluble specific substance of pneumococcus. I. The isolation and properties of the acetyl polysaccharide of pneumococcus type I. *J Exp Med*. 1933. 58: 731-755.
- Avery, O.T., Heidelberger, M. Immunological relationships of cell constituents of pneumococcus. Second paper. *J Exp Med*. 1925. 42: 367-376.
- Azanza, J.R. Farmacodinamia y métodos de administración de fármacos. *Rev Esp Quimioter*. 2005. 18: 90-94.
- Azoulay-Dupuis, E., Moine, P., Rieux, V., Vallee, E. Amoxicillin dose-effect relationship with *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model and roles of in vitro penicillin susceptibilities, autolysis, and tolerance properties of the strains. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1996. 40, 941-6.
- Ball, J.P., Baquero, F., Cars, O., File, T., Garau, J., Klugman, K., Low, D.E., Rubinstein, E., Wise, R. Consensus Group on Resistance and Prescribing in Respiratory Tract Infection. Antibiotic therapy of community respiratory tract infections: strategies for

- optimal outcomes and minimized resistance emergence. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 31-40.
- Bandak, S.I., M.R. Turnak, B.S. Allen, L.D. Bolzon, D.A Preston, S.K. Bouchillon and D.J. Hoban. Antibiotic susceptibilities among recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from fifteen countries. Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis. 2001. 20: 55-60.
- Baquero, F., García-Rodríguez, J.A., García de Lomas, J., Aguilar, L. and the Spanish surveillance group for Respiratory pathogens. Antimicrobial resistance of 1,113 *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with respiratory tract infections in Spain: results of a 1-year (1996–1997) multicenter surveillance study. Antimicrob Agents Chemother. 1999 a, 43: 357-359.
- Baquero, F., García-Rodríguez, J.A., García de Lomas, J., Aguilar, L. and the Spanish surveillance group for Respiratory pathogens. Antimicrobial resistance of 914 beta-hemolytic streptococci isolated from pharyngeal swabs in Spain: results of a 1-year (1996–1997) multicenter surveillance study. Antimicrob Agents Chemother. 1999 b. 43: 178-180.
- Baquero, F., Martínez-Beltran, J., Loza, E. A review of antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. J Antimicrob Chemother. 1991. 28(Suppl.C): 31-38.
- Barberán, J., García Rodríguez, J.A., González, J., Prieto, J.. Historia de los antimicrobianos. SCM, S.L. Madrid, 2003.
- Barberán, J., Giménez, M.J., Aguilar, L., Prieto, J. Scientific evidence and global conception of empirical treatment of lower respiratory tract infections in the community. Rev Esp Quimioter 2004; 17: 317-324.
- Barger A, Fuhst C, Wiedemann B. Pharmacological indices in antibiotic therapy. J Antimicrob Chemother. 2003; 52(6): 893-8.
- Barricarte, A., Castilla, J., Gil-Setas, A., Torroba, L., Navarro-Alonso, JA., Irisarri, F., Arriazu, M. Effectiveness of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine: a population-based case-control study. Clin Infect Dis. 2007. 1; 44(11): 1436-41.

- Barry, AL., Fuchs, PC. and Brown, SD. Identification of β -lactamase-negative, ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* with four methods and eight media. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. 45: 1585-1588.
- Bergmann, C., Chi, F., Rachid, S., Hakenbeck, R. Mechanisms for penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins, gene transfer and cell wall metabolism. In: Toumanen, E., Michell, T.J., Morrison, D.A., Spratt, B.G. (eds.) *The Pneumococcus*. ASM Press, Washington D.C. 2004. P: 339-349.
- Bigger, J.W. The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. *Ir J Med Sci* 1944; 227: 533-568.
- Blaser, J., Stone, BB., Groner, MC., Zinner, SH. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and the emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987. 31, 1054–60.
- Blaser, J., Stone, BB., Zinner, SH. Efficacy of intermittent versus continuous administration of netilmicin in a two-compartment in vitro model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1985. 27: 343–9.
- Blondeau, J.M., Suter, M., Borsos, S. and The Canadian Antimicrobial Study Group. Determination of the antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis*. *J Antimicrob Chemother.* 1999. 43(Supp.A): 25-30.
- Boubakar, BB. Bernard, A., Iliadis, A., Quentin, C., Ducint, D., Etienne, R., Fourtillan, M., Maachi-Guillot, I., Saux, M.C. New approach for accurate simulation of human pharmacokinetics in an in vitro pharmacodynamic model: application to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 2001. 47; 223-227.
- Briles, DE., Ades, E., Paton, JC., Sampson, JS., Carlone, GM., Huebner, RC., Virolainen, A., Swiatlo, E., Hollingshead, SK. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2000; 68(2): 796-800.

- Bronzwaer, S., Cars, O., Buchholz, U., Mölstad, S., Goettsch, W., Veldhuijzen, IK., Kool, JL., Sprenger, MJ., Degener, JE; European Antimicrobial Resistance Surveillance System. al. A european study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis.* 2002; 3: 278-282.
- Bruyn, GA., Zegers, BJ., van Furth, R. Mechanisms of host defence against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Infect. Dis.* 1992. 14: 251-262.
- Cafini, F., del Campo, R., Alou, L., Sevillano, D., Morosini, MI., Baquero, F., Prieto, J.; Spanish Pneumococcal Network (G03/103). Alterations of the penicillin-binding proteins and murM alleles of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates with high-level resistance to amoxicillin in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2006. 57(2): 224-9.
- Cantón, R., Valdezate, S., Mir, N. Resistencia a los antimicrobianos En: García Sánchez JE, López R, Prieto J, Eds. *Antimicrobianos en Medicina*. Barcelona: Prous Science. 1999: 41-71.
- Casal, J. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*. Serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982; 22: 222-225.
- Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 1997. 46(RR-8):1-24.
- Claverys, JP., Prudhomme, M., Mortier-Barrière, I., Martin, B. Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Mol. Microbiol.* 2000. 35 (2): 251-259. 35: 251-259.
- Coffey, TJ., Enright, MC., Daniels, M., Morona, JK., Morona, R., Hryniewicz, W., Paton, J. C., and. Spratt, BG. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 1998.27:73-83
- Coles, CL., Kanungo, R., Rahmathullah, L., Thulasiraj, RD., Katz, J., Santosham, M., Tielsch, JM. Pneumococcal nasopharyngeal colonization in young South Indian infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20(3): 289-95.

- Craig, WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis. 1998. 26: 1-10.
- Craig, WA., Andes, D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in otitis media. Pediatr infect Dis J. 1996. 15:255-259.
- Croisier, D., Chavanet, P., Lequeu, C. et al. (2002). Efficacy and pharmacodynamics of simulated human-like treatment with levofloxacin on experimental pneumonia induced with penicillin-resistant pneumococci with various susceptibilities to fluoroquinolones. J Antimicrob Chemother. 50: 349-60
- Dagan, R., Isaachsen, M., Lang, R., Karpuch, J., Block, C., Amir, J. Epidemiology of pediatric meningitis caused by *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria meningitidis* in Israel: a 3-year nationwide prospective study. Israeli Pediatric Bacteremia and Meningitis Group. J Infect Dis. 1994; 169(4): 912-6.
- Dagan, R., Klugman, KP., Craig, WA, Baquero, F. Evidence to support the rationale that bacterial eradication in respiratory tract infection is an important aim of antimicrobial therapy. J Antimicrob Chemother. 2001. 47: 129-140.
- Danish, M. Clinical pharmacokinetics. In: S. J. Yaffe, J.V. Aranda (eds.) 2nd ed. Pediatric pharmacology: therapeutic principles in practice. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1992; p. 22-28.
- Davidson, M., Parkinson, AJ., Bulkow, LR., Fitzgerald, MA., Peters, HV., Parks, DJ. he epidemiology of invasive pneumococcal disease in Alaska, 1986-1990--ethnic differences and opportunities for prevention. 1994. J Infect Dis. 1994; 170(2): 368-76.
- Doern, GV. and the Alexander Project Collaborative Group. Antimicrobial resistance among lower respiratory tract isolates of *Haemophilus influenzae*: results of a 1992-93 Western Europe and USA collaborative surveillance study. J Antimicrob Chemother 1996. 38(Suppl.A): 59-69.
- Doern, GV. Antimicrobial use and the emergence of antimicrobial resistance with *Streptococcus pneumoniae* in the United States. Clin Infect Dis. 2001. 15;33 Suppl 3 S: 187-92.

- Donowitz G, Mandell, G. Acute pneumonia. En: Principles and practice of infectious diseases. Mandell G, Bennett's J, Dolin R. Ed. 5ª Ed Churchill Livingstone Philadelphia 2000. Págs. 682-701.
- Dowson, CG., Coffey, TJ., Spratt, BG. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to β -lactam antibiotics. Trends Microbiol. 1994. 2: 361-365.
- Drusano GL, Craig WA. Relevance of pharmacokinetic and pharmacodynamics in the selection of antibiotics for respiratory tract infections. J Antimicrob Chemother 1997; 9 (suppl 3): 38-44.
- Enright, M C., Fenoll, A., Griffiths, D., Spratt, B. G. The three major Spanish clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* are the most common clones recovered in recent cases of meningitis in Spain. J Clin Microbiol. 1999 a. 37:3210-6.
- Enright, MC., Spratt, BG. Multilocus sequence typing. Trends Microbiol 1999 b. 7:482-487.
- Eskola, J., Antilla, M. Pneumococcal conjugate vaccines. Pediatr Infect Dis J. 1999. 18: 543-551.
- Eskola, J., Black, S., Shinefield, H. Vacunas antineumocócicas conjugadas. En Vacunas primera edición española. Capítulo 23 Plotkin, Oresteín, Picazo Ed ACINDES. 2007. p: 605-645.
- Feikin, DR., Klugman, KP. Historical changes in pneumococcal serogroup distribution: implications for the era of pneumococcal conjugate vaccines. Clin Infect Dis. 2002. 1; 35(5): 547-55.
- Feldman, C. y Klugman, KP. Pneumococcal infections. Curr Opin Infect Dis. 1997. 10: 109-115.
- Felmingham, D. and Gruneberg RN.. The Alexander project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. Antimicrob Agents Chemother. 2000. 45: 191-203.

- Fenoll, A., Asensio, G., Jado, I., Berrón, S., Camacho, MT., Ortega, M., Casal, J. Antimicrobial susceptibility and pneumococcal serotypes. J Antimicrob Chemotherapy. 2002. 50(S2): 13-19.
- Fenoll, A., Burgon, CM., Muñoz, R., Vicioso, D., Casal, J. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979–1989. Rev. Infect. Dis. 1991. 13: 56–60.
- Fenoll, A., Jado, I., Vicioso, D., Berrón, S., Yuste, JE., Casal J. *Streptococcus pneumoniae* in children in Spain: 1990-1999. Acta Pediatric Suppl 2000. 435:44-50.
- Fenoll, A., Jado, I., Vicioso, D., Pérez A., Casal, J. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: Update (1990 to 1996). J Clin Microbiol. 1998; 36: 3447-3454.
- Fernández Roblas, R., Granizo, J.J., Soriano, F. Pharmacodynamics of antibiotics in otitis media. Med Clin (Barc) 2000; 115: 70-72.
- Filipe, SR., Tomasz, A. Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall mucopeptide branching genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000. 25; 97(9): 4891-6.
- Finlay, J., Miller, L., Poupard, JA. A review of the antimicrobial activity of clavulate. J Antimicrob Chemother. 2003. 52: 8-23.
- Garau, J., Twynholm, M., García-Méndez, E., Siquier, B., Rivero, A.; 557 Clinical Study Group. Oral pharmacokinetically enhanced co-amoxiclav 2000/125 mg, twice daily, compared with co-amoxiclav 875/125 mg, three times daily, in the treatment of community-acquired pneumonia in European adults. J Antimicrob Chemother. 2003; 52(5): 826-36
- García Rodríguez J.A., García Sánchez J.E., Gobernado M., Picazo J.J., Prieto J. Antimicrobianos en Medicina 2ª edición. Prous. 2006. ISBN: 978-84-8124-240-9.
- García-Rey, C., Aguilar, L., Baquero, F., Casal, L, Dal-Ré, R. Importance of local variations in antibiotic consumption and geographical differences of erythromycin and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2002; 40: 159-164.

- García-Rodríguez, J.A., Baquero, F., García de Lomas, J., and Aguilar, L. Antimicrobial susceptibility of 1,422 *Haemophilus influenzae* isolates from respiratory tract infections in Spain. Results of a 1-year (1996-97) multicenter surveillance study. Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Infection. 1999. 27: 265-267.
- García-Rodríguez, JA. y Picazo, JJ. Microbiología Médica General Mosby/Doyma Libros, S.A. Madrid. ISBN: 84-8174-170-1. 1996.
- García-Sicilia López, J. Nuevas vacunas antineumocócicas. Más allá del neumococo. Rev Esp Quimioterap. 2007. 20 (1): 119-121.
- García-Suárez, MM., Vázquez, F., and Méndez, FJ. *Streptococcus pneumoniae* virulence factors and their clinical impact: an update. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006. 24: 512-517.
- Gillespie, SH. Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence, host response and vaccination. J Med Microbiol. 1989; 28(4): 237-48.
- Goffin, C., Ghuysen, JM. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. 62: 1079-1093.
- Granizo, J.J., Aguilar, L., Casal, J., García-Rey, C., Dal-Re, R. and Baquero, F. *Streptococcus pneumoniae* resistance to erythromycin and penicillin in relation to macrolide and beta-lactam consumption in Spain (1979-1997). J Antimicrob Chemother. 2000. 46: 767-773.
- Grebe T, Hakenbeck R. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40(4): 829-34.
- Gruneberg, RN. Antibiotic sensitivities of urinary pathogens, 1971-8. J Clin Pathol 1980; 33: 853-856.
- Grupo para el Estudio de la Infección en Urgencias. Estudio epidemiológico de las infecciones en el Área de Urgencias. Emergencias 2000; 12: 80-89.
- Gunn, BA., Woodall, JB., Jones, JF., Thornsberry, C. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Lancet. 1974; 2: 845.

- Hakenbeck, R., Grebe, T., Záhner, D., Stock, JB. beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. Mol Microbiol. 1999; 33(4): 673-8.
- Hakenbeck, R., Kaminski, K., König, A., van der Linden, M., Paik, J., Reichmann, P., Záhner, D. Penicillin-binding proteins in β -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. In: Tomasz, A., (ed.). *Streptococcus pneumoniae*. Molecular biology & Mechanisms of disease. Mary Ann Liebert, Larchmont, NY. 2000. P: 433-441.
- Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Müller, E., Rohde, M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. Infect Immun. 2005. 73(8): 4653-67.
- Hansman, D. y Bullen, MM. A resistant pneumococcus. Lancet. 1967; 2: 264-265.
- Hausdorff, WP., Bryant, J., Paradiso, PR., Siber, GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. Clin Infect Dis. 2000. 30(1):100-21.
- Hausdorff, WP., Feikin, DR., Klugman, KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. Lancet Infect Dis. 2005; 5(2): 83-93.
- Hausdorff, WP., Yothers, G., Dagan, R., Kilpi, T., Pelton, SI., Cohen, R., Jacobs, MR., Kaplan, SL., Levy, C., Lopez, EL., Mason, EO Jr., Syriopoulou, V., Wynne, B., Bryant, J. Multinational study of pneumococcal serotypes causing acute otitis media in children. Pediatr Infect Dis J. 2002; 21(11): 1008-16.
- Hendley, JO., Sande, MA., Stewart, PM., Gwaltney, Jr. Spread of *Streptococcus pneumoniae* in families. I. Carriage rates and distribution of types. J Infect Dis, 1975. 132: 55-61.
- Henrichsen, J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*, J.Clin.Microbiol., 1995. 33, 2759-2762.
- Hermans, PW., Sluijter, M., Dejsirilert, S., Lemmens, N., Elzenaar, K., van Veen A, Goessens WH, de Groot R. Molecular epidemiology of drug-resistant pneumococci: toward an international approach. Microb Drug Resist. 1997; 3(3): 243-51.

- Horne, D., Plotch, R, Tomasz, A. Cell surface components implicated as attachment sites for the pneumococcal competence activator. En: Portoles, A. (Ed.). Bacterial transformation and transfection: Proceedings of the 3rd European meetings on genetic transformation, North Holland, Amsterdam. 1974. 11-34.
- Hsueh, P., Liu, Y., Shyr, S., Wu, T., Yan, J., Wu, J., Leu, H., Chuang, Y., Lau Y., Luh, K. Multicenter Surveillance of Antimicrobial Resistance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in Taiwan during the 1998–1999 Respiratory Season. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000. 44: 1342-1345.
- Hutchison, BG., Oxman, AD., Shannon, HS., Lloyd, S., Altmayer, CA., Thomas, K. Clinical effectiveness of pneumococcal vaccine. Meta-analysis. *Can Fam Physician.* 1999. 45:2381-93.
- Jedrzejewski, MJ. Pneumococcal virulence factors : structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001. 65:187-207.
- Johston, RB Jr. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev Infect Dis.* 1991. 13(suppl 6): S509-17.
- Kamerling, JP. Pneumococcal polysaccharides: a chemical review. In: Tomasz A. Ed. *Streptococcus pneumoniae*. Molecular biology & mechanisms of disease. Mary Ann Liebert, Larchmont, NY, 2000; p: 81-114.
- Kaye, CM., Allen, A., Perry, S., McDonagh, M., Davy, M., Storm, K., Bird, N., Dewit, O. The clinical pharmacokinetics of a new pharmacokinetically enhanced formulation of amoxicillin/clavulanate. *Clinical Therapeutics.* 2001. 23, 578–84.
- Khan, W., Starr SE., Rodríguez, W., Controni, G., Sa AK. *Haemophilus influenzae* type of resistant to ampicillin: A report of two cases. *JAMA.* 1974; 229: 298-301.
- King, JC Jr., Vink, PE., Farley, JJ., Parks, M., Smilie, M., Madore, D., Lichenstein, R., Malinoski, F. Comparison of the safety and immunogenicity of a pneumococcal conjugate with a licensed polysaccharide vaccine in human immunodeficiency virus and non-human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J.* 1996; 15(3):192-6.

- Kislask, JW., Razavi, LMB., Daly, AK., Finland, M. Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am J Med: Sci.* 1965; 250: 261-268.
- Klein, JO. Otitis media. *Clin Infect Dis.* 1994; 19(5): 823-33.
- Klugman, KP., Low, DE., Metlay, J., Pechere, JC., Weiss, K. Community-acquired pneumonia: new management strategies for evolving pathogens and antimicrobial susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 24(5): 411-22.
- Kosowska, K., Jacobs, MR., Bajaksouzian, S., Koeth, L., Appelbaum, PC. Alterations of penicillin-binding proteins 1A, 2X, and 2B in *Streptococcus pneumoniae* isolates for which amoxicillin MICs are higher than penicillin MICs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004. 48(10): 4020-2.
- Labia, R., Peduzzi, J. Kinetics of β -lactamase inhibition by clavulanic acid *Biochem Biophys Acta* .1978; S26: 572-579.
- Lacks, S, Neuberger, M. Membrane location of a deoxyribonuclease implicated in the genetic transformation of *S. pneumoniae*. *J Bacteriol.* 1975. 124:1321-1329.
- Lalitha, MK., Thomas, K., Kumar, RS., Steinhoff, MC. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by coagglutination with 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* 1999. 37:263-265.
- Lefevre, JC., Faucon, G., Sicard, AM., Gasc, AM. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1996.34:1176-1179.
- Leino, T., Auranen, K., Jokinen, J., Leinonen, M., Tervonen, P., Takala, AK. Pneumococcal carriage in children during their first two years: important role of family exposure. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20(11): 1022-7.
- Levine, MM., Lagos, R., Levine, OS., Heitmann, I., Enriquez, N., Pinto, ME., Alvarez, AM., Wu, E., Mayorga, C., Reyes, A. Epidemiology of invasive pneumococcal infections in infants and young children in Metropolitan Santiago, Chile, a newly industrializing country. *Pediatr Infect Dis J.* 1998; 17(4): 287-93.

- Liñares, J., Pallarés, R., Alonso, T., Perez, JL., Ayats, J., Gudiol, F., Viladrich, PF., Martin, R. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-1990). Clin Infect Dis. 1992. 15(1): 99-105.
- Lipsitch, M., Dykes, JK., Johnson, SE., Ades, EW., King, J., Briles, DE., Carlone, GM. Competition among *Streptococcus pneumoniae* for intranasal colonization in a mouse model. Vaccine. 2000. 15; 18(25): 2895-901
- Llull, D., López, R., García, E. Genetic bases and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenic streptococci, Curr Mol Med, 2001. 1, 475-491.
- López, B., Cima, MD., Vázquez, F., Fenoll, A., Gutiérrez, J., Fidalgo, C., Caicoya, M., Méndez, FJ. Epidemiological study of *Streptococcus pneumoniae* carriers in healthy primary-school children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999; 18(11):7 71-6.
- Löwdin, E., Cars, O., Odenholt, I. Pharmacodynamics of amoxicillin/clavulanic acid against *Haemophilus influenzae* in an in vitro kinetic model: a comparison of different dosage regimens including a pharmacokinetically enhanced formulation. Clinical Microbiol Infect. 2002. 8, 646–53.
- MacGowan, AP., Noel, AR., Rogers, CA., Bowker, KE. Antibacterial effects of amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* strains for which MICs are high, in an in vitro pharmacokinetic model. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(7): 2599-603
- Macris, MH., Hartman, N, Murray, B., Klein, RF., Roberts, RB., Kaplan, EL., Horn, D., Zabriskie, JB. Studies of the continuing susceptibility of group A streptococcal strains to penicillin during eight decades. Pediatr Infect Dis J. 1998; 17(5): 377-81.
- Marco, F., Bouza, E., García de Lomas, J., Aguilar, L and the Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. *Streptococcus pneumoniae* in community-acquired respiratory tract infections in Spain: The impact of serotype and geographical, seasonal and clinical factors on its susceptibility to the most commonly prescribed antibiotics. J Antimicrob Chemother. 2000. 46: 557-64.

- Marco, F., García-de-Lomas, J., García-Rey, C., Bouza, E., Aguilar, L., Fernández-Mazarrasa, C.; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial susceptibilities of 1,730 *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Spain in 1998-1999. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(11): 3226-8.
- Martín-Herrero, JE., García-Rey, C., Giménez-Mestre, MJ., Aguilar-Alfaro, L. Estrategias para superar las resistencias de patógenos respiratorios en Atención Primaria. *Rev Esp Quimioterap.* 2003; 16:108-104
- Moreillon, P., Tomasz, A. Penicillin resistance and defective lysis in clinical isolates of pneumococci: evidence for two kinds of antibiotic pressure operating in the clinical environment. *Journal of Infectious Diseases.* 1998. 157, 1150-7.
- Morona, JK., Morona, R., Paton, JC. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 2006. 103(22): 8505-8510.
- Möslstad, S., Lundborg, CS., Karlsson, AK., Cars, O. Antibiotic prescription rates very markedly between 13 European countries. *Scand J Infect Dis.* 2002. 34: 366-371.
- Mueller, M., De la Peña, A., Derendorf, H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2004. 48: 369–77
- Mufson, MA. 1990. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell, GL., Douglas, RG Jr and Bennett, JE (ed.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia. Churchill Livingstone, Inc, New York, N. Y. p. 1539-1550.
- Muñoz, R., Coffey, TJ., Daniels, M., Dowson, CG., Laible, G., Casal, J., Hakenbeck R., Jacobs, M., Musser, JM., Spratt, BG., et al. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 1991; 164(2): 302-6.
- Muñoz, R., Musser, JM., Crain, M., Briles, DE., Marton, A., Parkinson, JJ. Sorensen U, Tomasz A. Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. *Clin Infect Dis.* 1992; 15(1): 112-8.

- Murray, P., Rosenthal, Ks., Kobayashi, GS., Pfaller, MA. *Streptococcus*. En Microbiología Médica 5ª ed. Elsevier España 2006. Capítulo 23. Pg: 237-258.
- Musher, DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell G.L., Bennett J. E., and Dolin R. (ed). Principles and Practice of Infections Diseases. Philadelphia. Churchill Livingstone, 2000; p.2128-2146.
- Musher, DM., Watson, DA., Baughn, RE. Does naturally acquired IgG antibody to cell wall polysaccharide protect human subjects against pneumococcal infection? J Infect Dis 1990. 161 :736-740.
- Nabors, GS., Braun, PA., Herrmann, DJ., Heise, ML., Pyle, DJ., Gravenstein, S., Schilling, M., Ferguson, LM., Hollingshead, SK., Briles, DE., Becker, RS. Immunisation of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein a (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. Vaccine. 2000. 18:1743-1754.
- Nagai, K., Davies, TA., Jacobs, MR., Appelbaum, PC. Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, intermediate and resistant pneumococci. Antimicrob Agents Chemother. 2002. 46: 1273-1280.
- Nelson, AL., Roche, AM., Gould, JM., Chim, K., Ratner, AJ. And Weiser, JN. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. Infect. Immun. 2007; 75(1): 83-90.
- Nesin, M., Ramirez, M., and Tomasz, A. Capsular transformation of a multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in vivo. J. Infect. Dis. 1998. 177:707-13.
- O'Brien, TF., Acar, JF., Medeiros, AA., Norton, RA., Goldstein, F., Kent, RL. International comparison of prevalence of resistance to antibiotics. J Am Med Assoc 1978: 1518-1523.
- Oteo, J., Alós, JI., Gómez-Garcés, JL. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates in 1999 and 2000 in Madrid, Spain: a multicentre surveillance study. J Antimicrob Chemother. 2001 a. 47: 215-218.

- Oteo, J., Alos, JI., Gómez-Garcés, JL. Sensibilidad *in vitro* actual de los patógenos respiratorios bacterianos más frecuentes: implicaciones clínicas. Med Clin (Bar). 2001 b. 116: 541-549.
- Pallarés, R., Capdevila, O., Grau, I. Treatment options for resistant pneumococcal infections. Clin Microbiol Infect. 1999. 5:4S3-4S11.
- Pankuch, GA., Visalli, MA., Jacobs, MR., Appelbaum, PC. Activities of oral and parenteral agents against penicillin-susceptible and resistant pneumococci. Antimicrob Agents Chemother. 1995. 39: 1499-104.
- Park, MK., Briles, DE., Nahm, MH. A latex bead-based flow cytometric immunoassay capable of simultaneous typing of multiple pneumococcal serotypes (Multibead assay). Clin Diagn Lab Immunol. 2000. 7:486-489.
- Parkinson, AJ., Davidson, M., Fitzgerald, M.A., Bulkow, L.R., Parks, D.J. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska 1986-1990. J. Infect. Dis. 1994. 170: 461-464.
- Payne, DJ., Cramp, R., Winstanley, DJ., Knowles, DJC. Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam and tazobactam against clinically important betalactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 767-772.
- Pérez-Trallero, E., Bouza, E., García de Lomas, J., García Rodríguez, JA., García Rey, C. 2000. Antimicrobial susceptibility of 1,685 *Streptococcus pneumoniae* isolates from respiratory infections in Spain (1998-1999). 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto 2000; Abstr. 1801.
- Pérez-Trallero, E., García-de-la-Fuente, C., García-Rey, C., Baquero, F., Aguilar, L., Dal-Ré, R., García-de-Lomas, J.; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 1965-1972.
- Pérez-Trallero, E., Marimón, JM., Gonzalez, A., Iglesias, L. Spain¹⁴-5 international multiresistant *Streptococcus pneumoniae* clone resistant to fluoroquinolones and other families of antibiotics. J Antimicrob Chemother. 2003. 51(3): 715-9.

- Pérez-Trallero, E., Urbrena, M., Montes, M., Ayestaran, I., Marimon, JM. Emergence of *S. pyogenes* strains resistant to erythromycin in Guipuzcua, Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 25-31.
- Picazo, JJ. Guía Práctica de Vacunaciones 2006. Editorial ICM. ISBN 84-933569-9-9 <http://www.vacunas.net>
- Picazo, JJ., Pérez-Cecilia, E., Herreras, A., Grupo DIRA en Atención Primaria. Estudio de las infecciones respiratorias extrahospitalarias. Estudio DIRA. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21: 410-416.
- Pichichero, ME., Casey, JR. Emergence of a multiresistant serotype 19A pneumococcal strain not included in the 7-valent conjugate vaccine as an otopathogen in children. *JAMA*. 2007. 17; 298(15): 1772-8
- Pomat, WS., Lehmann, D., Sanders, RC., Lewis, DJ., Wilson, J., Rogers, S., Dyke, T., Alpers, MP. Immunoglobulin G antibody responses to polyvalent pneumococcal vaccine in children in the highlands of Papua New Guinea. *Infect Immun*. 1994. 62(5): 1848-53.
- Preston, SL., Drusano, GL., Berman, AL., Fowler, CL., Chow, AT., Dornseif, B., Reichl, V., Natarajan, J., Corrado, M. Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials. *JAMA*. 1998. 14; 279(2): 125-9.
- Ramirez, M., and Tomasz, A. Acquisition of new capsular genes among clinical isolates of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist*. 1999. 5: 241-6.
- Raymond, J., Le Thomas, I., Moulin, F., Commeau, A., Gendrel, D., Berche, P. Sequential colonization by *Streptococcus pneumoniae* of healthy children living in an orphanage. *J Infect Dis*. 2000. 181: 1983-1988.
- Reading, C., Cole, M. Clavulanic acid: A β -lactamase-inhibiting β -lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 11: 852-857.
- Rijkers, GT., Sanders, EAM., Breukels, MA., Zegers, BJM. Responsiveness of infants to capsular polysaccharides: implications for vaccine development. *Rev Med Microbiol*. 1996. 7:3-12.

- Rijkers, GT., Sanders, LA., Zegers, BJ. Anti-capsular polysaccharide antibody deficiency states. *Immunodeficiency*. 1993. 5: 1-21.
- Ripoll, MA., Orero, A., Vicente, D., Navarro, A., González, J., Prieto, J., y el Grupo Musa. Evaluación de los criterios de selección de antimicrobianos por los médicos generales y de familia. *Rev Esp Quimioter*. 2008; 21(1): 26-31.
- Rollinson, GN. A review of the microbiology of amoxicillin/clavunate over the 15 years period 1978-1993. *J Chemother*. 1994. 6: 283-318.
- Romero-Steiner, S., Libutti, D., Pais, LB., Dykes, J., Anderson, P., Whitin, JC., Keyserling, HL., Carlone, GM. Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997; 4(4): 415-22.
- Romero-Vivas, J., Rubio Alonso, M., Corral ,O., Pacheco, S., Agudo, E. y Picazo, J.J. Estudio de las infecciones respiratorias extrahospitalarias. *Enferm Infec Microbiol. Clin*. 1997. 15: 289-298.
- Rubins, JB., Alter M, Loch, J., Janoff. En Determination of antibody responses of elderly adults to all 23 capsular polysaccharides alter pneumococcal vaccination. *Infect Immun*. 1999. 67: 5979-5984.
- Sa-Leao, R., A. Tomasz, I. S. Sanches, S. Nunes, C. R. Alves, A. B. Avo, J. Saldanha, K. G. Kristinsson, and H. de Lencastre. Genetic diversity and clonal patterns among antibiotic-susceptible and - resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children: day care centers as autonomous epidemiological units. *J. Clin. Microbiol*. 2000. 38:4137-4144.
- Sangren, A., Sjostrom, K., Olsson-Liljequist, B., Christensson, B., Samuelsson, A., Kronvall, G., Henriques Normark, B. Effect of clonal and serotype-specific properties on the invasive capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2004. 1;189(5): 785-96.
- Severin, A., Severina, E., Tomasz, A. Abnormal physiological properties and altered cell wall composition in *Streptococcus pneumoniae* grown in the presence of clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(3): 504-10.

- Sevillano, D., Calvo, A. Giménez, MJ., Alou, L., Aguilar, L., Valero, E., Carcas, A., Prieto, J. Bactericidal activity of amoxicillin against non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacodynamic model simulating the concentrations obtained with the 2000/125 mg sustained-release co-amoxiclav formulation. 2004. J Antimicrob Chemother. 54(6): 1148-51.
- Shatz, DV., Schinsky, MF., Pais, LB., Romero-Steiner, S., Kirton, OC., Carlone, GM. Immune responses of splenectomized trauma patients to the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine at 1 versus 7 versus 14 days after splenectomy. J Trauma. 1998; 44(5): 760-5.
- Shuchat, A., Hillier, S., Edwards, K., Schrag, S., Labbok, M. Early opportunities for prevention: infections of pregnant women and young infants. Emerg Infect Dis. 2001; 7(3 Suppl): 532.
- Shurin, PA., Rehms, JM., Johnson, CE., Marchant, CD., Carlin, SA., Super, DM., Van Hare, GF., Jones, PK., Ambrosino, DM., Siber, GR. Bacterial polysaccharide immune globulin for prophylaxis of acute otitis media in high-risk children. 1993. J Pediatr. 1993; 123(5): 801-10.
- Smit, P., Oberholzer, D., Hayden-Smith, S., Koornhof, HJ., Hilleman, MR. Protective efficacy of pneumococcal polysaccharide vaccines. JAMA. 1977. 12; 238(24): 2613-6.
- Sniadack, DH., Schwart, B., Lipman, H., Bogaerts, J., Butler, JC., Dagan, R., Echaniz-Aviles, G., Lloyd-Evans, N., Fenoll, A., Girgis, NI. et al.. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children implications for vaccine strategies. Pediatric Infect Dis J. 1995. 14:503-510.
- Soares, S., Kristinsson, KG., Musser, JM. and Tomasz, A. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. J. Infect Dis. 1993. 168: 158-63. 19.
- Soriano, F. Fundamentos farmacocinéticos y farmacodinámicos. En: Guerrero A. Uso adecuado de antimicrobianos en atención primaria. Science Tools, S.L. 2006. p: 51-82.

- Sternberg, GM. A fatal form of septicemia in the rabbit produced by subcutaneous injection of human saliva: An experimental research. Natl. Bd. Health Bull. 1881.2: 781-783.
- Stoeckle, MY., Douglas, RG Jr. Infectious diseases. JAMA. 1994. 1; 271(21): 1677-9.
- Syrogianopoulos, GA., Bogaert, D., Grivea, IN., Beratis, NG., De Groot, RR., Hermans, PW. Molecular epidemiology of penicillin-susceptible, multidrug-resistant serotype 6B pneumococci isolated from children in Greece. J Clin Microbiol. 2001; 39(2): 581-5.
- Tenover, FC., Arbeit, RD., Goering, RV., Mickelsen, PA., Murray, BE., Persing, DH. and Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995. 33: 2233-2239.
- Thornsberry, C., Jones, ME., Hickey, ML., Mauriz, Y., Kahn, J., Sahm, DF. Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated in the United States, 1997-1998. J Antimicrob Chemother. 1999 b. 44: 749-59.
- Thornsberry, C., Ogilvie, PT., Holley, HP., Sahm, DF. Survey of susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolates to 26 antimicrobial agents: a prospective U.S. study. Antimicrob Agents Chemother. 1999 a. 43: 2612–2623.
- Trotman, J., Hughes, B., Mollison, L. Invasive pneumococcal disease in central Australia. Clin Infect Dis. 1995. 20: 1553-1556.
- Van Dam, JEG., Fleer, A., Snippe, H. Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. Ant. van Leeuw. J Microbiol 1990. 27: 1-47.
- Van Kerkhoven, D., Peetermans, WE., Verbist, L., Verhaegen, J. Breakthrough pneumococcal bacteraemia in patients treated with clarithromycin or oral beta-lactams. J Antimicrob Chemother. 2003;51(3):691-6.

- Watson, DA., Musher, DM. Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. Infect Immun. 1990. 58: 3135-3138.
- White, AR., Boon, RJ., Masters, PJ., Sutherland, R. Actividad antibacteriana de amoxicilinalácido clavulánico (augmentine) in vi/ro. En: Augmentine. Revisión microbiológica, farmacológica y clínica. Laboratorios Beecham, SA. (Eds.). Temis, SA., Barcelona 1989; 3-18
- Williamson, R., Hakenbecky, R., Tomasz, A. The penicillin binding proteins of *S. pneumoniae* grown under lysis permissive and lysis protective (tolerant) conditions. F.E.M.S. Microbial Letters. 1980. 7:127-131.
- Wright, DH., Brown, GH., Peterson, ML., Totschafer, JC. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. J Antimicrob Chemother. 2000; 46: 669-683.
- Yagupsky, P., Porat, N., Fraser, D., Prajgrod, F., Merires, M., McGee, L., Klugman, KP., Dagan, R. Acquisition, carriage, and transmission of Pneumococci with decreased antibiotic susceptibility in young children attending a day care facility in southern Israel. J. Infect. Dis. 1998. 177: 1003-1012.

Bactericidal activity of amoxicillin against non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacodynamic model simulating the concentrations obtained with the 2000/125 mg sustained-release co-amoxiclav formulation

David Sevillano¹, Almudena Calvo¹, María-José Giménez¹, Luis Alou¹, Lorenzo Aguilar¹,
Eva Valero¹, Antonio Carcas² and José Prieto^{1*}

¹Microbiology Department, School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid; ²Pharmacology Unit, Universidad Autónoma, Madrid, Spain

Received 20 May 2004; returned 22 July 2004; revised 6 September 2004; accepted 14 September 2004

Objectives: To investigate the bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* of simulated amoxicillin serum concentrations obtained in humans after 2000/125 mg sustained-release (SR) and 875/125 mg co-amoxiclav administered twice and three times a day, respectively.

Methods: An *in vitro* computerized pharmacodynamic simulation was carried out and colony counts were determined over 24 h. Ten strains non-susceptible to amoxicillin (four of them exhibiting an MIC of 4 mg/L, five strains with an MIC of 8 mg/L and one strain with an MIC of 16 mg/L) were used.

Results: With amoxicillin 2000 mg, an initial inoculum reduction >99.99% was obtained for strains with an MIC of 4 mg/L, ≥99% for strains with an MIC of 8 mg/L and 70.6% for the strain with an MIC of 16 mg/L at 24 h sampling time. At this sampling time, no reduction of initial inocula was obtained with amoxicillin 875 mg/8 h for two of the four strains with an MIC of 4 mg/L, three of the five strains with an MIC of 8 mg/L or for the strain with an MIC of 16 mg/L.

Conclusions: The new co-amoxiclav 2000/125 mg SR formulation appears to offer advantages versus previous formulations with respect to bactericidal activity against current amoxicillin non-susceptible strains.

Keywords: β -lactams, pneumococcal isolates, inocula decrease

Introduction

A pharmacokinetically enhanced formulation of co-amoxiclav (16:1) that gives a time over MIC of at least 50% for strains with an amoxicillin MIC of 4 mg/L, with a twice daily administration for adults, has been developed.¹

Because the bactericidal activity of an antibiotic is important for pathogen eradication, and the more potent an antimicrobial agent the less likely is resistance selection,² the aim of this study was to investigate the bactericidal activity of this new formulation. In this study, we report the bactericidal activity of this new amoxicillin formulation in an *in vitro* model, as compared with the activity obtained with the previous 875/125 mg formulation, by simulating serum concentrations obtained in humans subsequent to those formulations.

Materials and methods

Bacterial strains

Ten strains of *Streptococcus pneumoniae* [four of them with an amoxicillin MIC of 4 mg/L (two serotype 9, one serotype 14 and one serotype 23), five with an MIC of 8 mg/L (one serotype 6, two serotype 14, one serotype 9 and one serotype 23) and one strain with an amoxicillin MIC of 16 mg/L (serotype 6)] were used. All strains were clinical isolates from community-acquired respiratory tract infections.

Antibiotic

Amoxicillin trihydrate laboratory reference standard was supplied by GlaxoSmithKline (Worthing, England, UK).

*Corresponding author. Tel: +34-91-3941508; Fax: +34-91-3941511; E-mail: jprieto@med.ucm.es

Amoxicillin pharmacodynamic simulation

MIC determination

MICs and MBCs were determined by a microdilution method following NCCLS methodology³ in Mueller–Hinton broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with calcium, magnesium and 5% lysed horse blood. Additionally, MICs (prior to and after the simulation process) were determined in Todd–Hewitt broth (Difco Laboratories) supplemented with 0.5% yeast extract, using dilution steps of 1 mg/L. All determinations were performed five times and modal values are reported.

In vitro kinetic model

The model derives from the two-compartment kinetic model with artificial capillary units proposed by Blaser *et al.*,^{4,5} and was designed to expose bacteria to changing antibiotic concentrations, without dilution of the bacterial inoculum. In brief, the model consists of a sterile central compartment (spinner flask, tubing and lumina of capillary bundles) representing the systemic circulation and a peripheral compartment representing the infection site (the intra-capsular circulating tubing and the extra-capillary space between the two connected hollow fibre capsule filters of 0.2 µm pore size and 550 cm² filtering surface; FiberFlo, Minntech Corp, Minneapolis, MN, USA). The selectively permeable capillary walls (capsule filters of 0.2 µm pore size) allow the bi-directional diffusion of antibiotics and nutrients between the central and peripheral compartments, but prevent bacterial penetration into the central compartment. Capsules are placed in a 37°C incubator. Computerized peristaltic pumps (Maxterflex; Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, USA) draw the Todd–Hewitt broth medium, at a programmed rate, from the reservoir [placed in a 37°C water bath (HB 4 basic; IKA, Staufen, Germany)] to the central compartment for antibiotic dilution. A computer-controlled syringe pump (402 Dilutor Dispenser; Gilson SA, Villiers-le-Bel, France) allows the simulation of concentrations in serum, by infusion of the antibiotic into the central compartment until the C_{\max} is reached. The antibiotic-containing medium is pumped at 6 mL/min to the peripheral compartment, where it passes through the capillary walls and is distributed in the extra-capillary space (where the antibiotic interacts with bacteria) by unidirectional pressure diffusion. Additional pumps circulate the antibiotic–medium mixture at 25 mL/min within the extra-capillary space, through the intracapsular circulating tubing. Afterwards the mixture is re-circulated back to the central compartment via a second hollow fibre capsule, in the opposite direction. The elimination of the medium is at the same rate as the replacement of fresh medium in the central compartment, which maintains a constant volume in the system (400 mL), allowing the simulation of the antibiotic half-life ($t_{1/2}$).

Kinetic simulations

Pharmacokinetic profiles of amoxicillin corresponding to the new co-amoxiclav 2000/125 mg sustained-release (SR) formulation (2000 mg of amoxicillin/12 h)¹ and to the conventional 875/125 mg formulation (875 mg of amoxicillin/8 h)⁶ were simulated over 24 h. The flow rates of the peristaltic pumps were programmed to obtain a clearance of 1.38 mL/min in the first phase (0–5 h) of the amoxicillin 2000 mg simulation and a clearance of 4.2 mL/min for the elimination phase (5–12 h) and at 4.2 mL/min for amoxicillin 875 mg. These two flows in the peristaltic pumps were synchronized over 24 h using Win Lin software (Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, USA).

Experiments

Prior to each experiment, 1–2 colonies from a fresh passage on Mueller–Hinton agar supplemented with cations and 5% lysed sheep blood, were inoculated in 20 mL of Todd–Hewitt broth supplemented with 0.5% yeast extract. The resulting suspension was allowed to grow to a density of 10⁶ cfu/mL, as measured by a UV spectrophotometer (Hitachi U-1100); 15 mL of this inoculum was introduced into the peripheral compartment of the *in vitro* model 1 h prior to each simulation process to allow the microorganism to adapt to the medium. All initial inocula were in the range 2.5×10^6 – 2.5×10^7 cfu/mL.

Samples (0.5 mL) from the peripheral compartment were collected at 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 16, 18, 20, 22 and 24 h. Each sample was serially diluted 10-fold in 0.9% sodium chloride for bacterial counting in supplemented Mueller–Hinton agar with 5% sheep blood, which was incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24 h. At least five dilutions for each sample (including the non-diluted sample) were plated in triplicate. The limit of detection was 5×10^1 cfu/mL, and each experiment was performed in triplicate.

Pharmacokinetic analysis

Pharmacokinetic analysis was performed in triplicate, in bacteria-free simulations under the same experimental conditions. Samples (0.5 mL) from the peripheral compartment were obtained at 0, 0.5, 1.5, 3, 4, 6, 8, 11 and 12 h for amoxicillin SR/12 h and at 0, 0.5, 1.5, 3, 4, 5 and 8 h for amoxicillin 875 mg/8 h. Concentrations were determined by bioassay using *Micrococcus luteus* ATCC 9341 as an indicator organism. All standards and samples were assayed in triplicate. The lower limit of detection was 0.06 mg/L, and the coefficient of variation between assays was 6.72% for the amoxicillin 2000 mg experiments and 7.61% for the amoxicillin 875 mg experiments.

Amoxicillin concentrations were analysed by a non-compartmental approach using the WinNonlin Professional program (Pharsight, Mountainview, CA, USA). Briefly, C_{\max} and T_{\max} were obtained directly from the observed data; the apparent elimination rate constant (k_{el}) was calculated as the best-fit slope obtained from linear regression using the last measurements in the terminal phase of the curve (at least three time-concentration pairs). The area under the concentration-time curve from 0 to last (C_{last}) measured concentration (AUC_{last}) was calculated by the trapezoidal rule. The area under the concentration-time curve (AUC) was calculated as AUC_{last} plus C_{last}/k_{el} . The time that concentrations exceeded the 1 mg/L step MIC ($t > \text{MIC}$) for each strain was calculated graphically by plotting mean concentrations at each time point versus time.

Statistical analysis

Mean cfu/mL were calculated from the three values of colony counts at each time during the 24 h simulation. Initial inoculum reduction (IIR) at a determined time point was calculated as a percentage reduction in bacterial count compared with the initial inoculum.

Differences in %IIR between treatments at each time point were determined by the Mann–Whitney *U*-test. A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

The mean serum concentrations simulated over time were 9.65, 16.09, 13.34, 11.49, 7.89, 2.20, 0.40 and 0.12 mg/L at

Table 1. Mean reductions of initial inocula over 24 h against the four strains with MIC 4 mg/L and the six strains with standard MIC ≥ 8 mg/L

Time (h)	MIC = 4 mg/L		MIC ≥ 8 mg/L	
	Amoxicillin SR 2000 mg	Amoxicillin 875/125 mg	Amoxicillin SR 2000 mg	Amoxicillin 875/125 mg
0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
1	95.00 \pm 3.23	92.85 \pm 5.89	89.57 \pm 7.27	79.06 \pm 36.64
3	99.63 \pm 0.20 ^a	97.53 \pm 2.67	96.38 \pm 8.08	99.06 \pm 1.02
8	$\geq 99.99 \pm 0.01$	99.37 \pm 0.65	99.99 \pm 0.02 ^b	98.31 \pm 2.76
12	99.97 \pm 0.06	99.86 \pm 0.16	99.50 \pm 0.67	94.84 \pm 8.78
16	99.98 \pm 0.05	88.62 \pm 22.41	99.70 \pm 0.39 ^b	38.65 \pm 79.37
20	$\geq 99.99 \pm 0.00$ ^a	27.37 \pm 142.33	99.92 \pm 0.11 ^b	34.93 \pm 98.75
22	$\geq 99.99 \pm 0.00$ ^a	62.58 \pm 65.72	98.71 \pm 2.95 ^b	-300.17 \pm 546.35
24	$\geq 99.99 \pm 0.00$ ^a	-1310.55 \pm 1741.21	94.78 \pm 11.83 ^b	-2482.24 \pm 3446.52

Regrowth is shown by negative values.

^a $P=0.028$ versus 875 mg at the indicated times.

^b $P \leq 0.005$ versus 875 mg at the indicated times.

0.5, 1.5, 3, 4, 6, 8, 11 and 12 h, respectively, for the 2000 mg amoxicillin formulation and 5.04, 12.19, 6.43, 3.83, 1.01 and 0.06 mg/L at 0.5, 1.5, 3, 4, 5 and 8 h, respectively, for the 875 mg amoxicillin formulation. Maximum serum concentrations (C_{\max}) were 16.1 \pm 0.3 mg/L and 12.2 \pm 2.0 mg/L and areas under the serum concentration-time curve (AUC) were 84.0 \pm 5.1 mg·h/L and 33.0 \pm 4.9 mg·h/L for amoxicillin 2000 and 875 mg, respectively. These values were within the range obtained in humans after administration of the doses simulated in this study, and in other pharmacodynamic simulations.⁷

When MICs/MBCs were determined using dilution steps of 1 mg/L, values obtained were (mg/L): 4/4 (two strains); 4/6 and 4/7 for strains with a standard MIC of 4 mg/L; 6/7, 6/8, 7/9, 8/8 and 8/9 for strains with a standard MIC of 8 mg/L; 9/9 for the strain with a standard MIC of 16 mg/L. Final isolates recovered at the end of the study showed the same (or one-step higher) MIC values as the initial isolates.

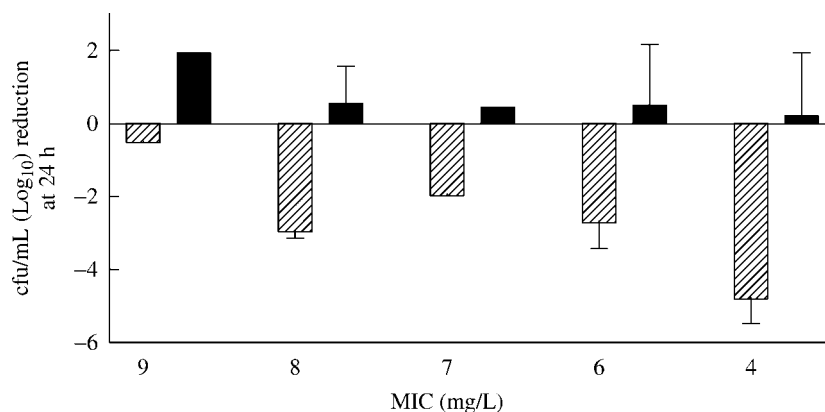
The time (% dosing interval) that serum levels exceeded the 1 mg/L step MIC ($t > \text{MIC}$) were in the range 19.16%–44.89% for amoxicillin 875 mg and 41.38%–59.3% for

amoxicillin 2000 mg, for strains exhibiting MICs of 9–4 mg/L, respectively.

Mean reductions (%) in initial inocula during the 24 h study period are shown in Table 1, for the four strains with a standard MIC of 4 mg/L and the six strains with a standard MIC of ≥ 8 mg/L. In the absence of amoxicillin, the initial inocula increased (considering 0% was at 0 h) to -15 194 \pm 14 698% at 8 h and to -10 296 \pm 6938% at 12 h for strains with an MIC of 4 mg/L, and to -17 094 \pm 15 038% at 8 h and to -3846 \pm 4059% at 12 h for strains with an MIC ≥ 8 mg/L.

Significant differences between both regimens (Table 1) for the strains with a standard MIC of 4 mg/L were found at the time points 20–24 h. The same differences were observed for strains with an MIC ≥ 8 mg/L from 6–12 h and from 16–24 h, with no reduction in colony counts in the latest periods for amoxicillin 875 mg/8 h.

By 24 h, amoxicillin 2000 mg produced an inoculum decrease $\geq 99.99\%$ for the four strains with an MIC of 4 mg/L, 98.95%–99.94% for the five strains with an MIC of 8 mg/L and 70.64% for the strain with an MIC of 16 mg/L. With amoxicillin 875 mg

**Figure 1.** Mean values and standard deviations of reductions in cfu/mL (\log_{10}) at 24 h obtained with the amoxicillin 875 mg/8 h (black bars) and amoxicillin SR 2000 mg/12 h (diagonally striped bars) formulations against strains grouped by 1 mg/L step MIC.

no reduction in counts at 24 h was obtained in two out of four strains with an amoxicillin MIC of 4 mg/L, in three out of five strains with an MIC of 8 mg/L or in the strain with an MIC of 16 mg/L.

Figure 1 shows mean values and standard deviations of reductions in cfu/mL (\log_{10}) at 24 h obtained with both formulations against strains as grouped by 1 mg/L step MIC.

Discussion

Although co-amoxiclav 2000 mg SR has shown a good clinical efficacy in community-acquired pneumonia,⁸ in such studies there would be only a small number of patients infected with pneumococci that have a high amoxicillin MIC. Since it is important to investigate situations for which clinical trials cannot provide an adequate response, in this case, because the probability of pathogens with a reduced susceptibility profile is low, the pharmacodynamic simulation reported here was carried out.

We chose a pharmacokinetic–pharmacodynamic approach based on killing curves as this is considered a more rational approach to describe drug–bacteria interactions than the classical MIC or 24 h MBC approach.⁹

Five of the 10 strains exhibited no reduction in initial inocula at 24 h with the amoxicillin 875 mg regimen. The surviving subpopulation exhibited an MIC similar to the prior simulation and can be considered tolerant to the amoxicillin 875 mg concentration profile after this third dose. Seventy percent of clinical isolates of penicillin-resistant pneumococci exhibit defective lysis, the prevalence of tolerance being much higher than in penicillin-susceptible strains.¹⁰ The tolerance traits are independent of alterations in penicillin binding proteins, and drug-specific tolerance is attributed to changes in control of autolysin activity rather than to survival after bactericidal doses.¹⁰ The tolerant behaviour observed with the amoxicillin 875 mg simulation was not observed with the amoxicillin 2000 mg simulation, probably due to the fact that the higher pharmacokinetic profile resulted in an increased $t > \text{MIC}$. Considering these results, we conclude that the new co-amoxiclav 2000/125 mg SR formulation has a better activity against amoxicillin non-susceptible strains than the current 875 mg formulation and that this improved activity against strains with tolerant behaviour to the pharmacokinetic profile of previous amoxicillin formulations may have a therapeutic translation.

Acknowledgements

We thank J. Dorado (Cibest, Madrid, Spain) for the statistical analysis. This study was supported by a grant from SmithKline Beecham (presently GlaxoSmithKline).

References

1. Kaye, C. M., Allen, A., Perry, S. *et al.* (2001). The clinical pharmacokinetics of a new pharmacokinetically enhanced formulation of amoxicillin/clavulanate. *Clinical Therapeutics* **23**, 578–84.
2. Doern, G. V. (2001). Antimicrobial use and the emergence of antimicrobial resistance with *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Clinical Infectious Diseases* **33**, Suppl. 3, S187–92.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1992). *Methods for Determining Bactericidal Activity for Antimicrobial Agents. Tentative Guideline M26-T*. NCCLS, Villanova, PA, USA.
4. Blaser, J., Stone, B. B. & Zinner, S. H. (1985). Efficacy of intermittent versus continuous administration of netilmicin in a two-compartment in vitro model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **27**, 343–9.
5. Blaser, J., Stone, B. B., Groner, M. C. *et al.* (1987). Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and the emergence of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**, 1054–60.
6. Balcabao, I. P., Aguilar, L., Martin, M. *et al.* (1996). Activities against *Streptococcus pneumoniae* of amoxicillin and cefotaxime at physiological concentrations: in vitro pharmacodynamic simulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 2904–6.
7. Löwdin, E., Cars, O. & Odenholt, I. (2002). Pharmacodynamics of amoxicillin/clavulanic acid against *Haemophilus influenzae* in an in vitro kinetic model: a comparison of different dosage regimens including a pharmacokinetically enhanced formulation. *Clinical Microbiology and Infection* **8**, 646–53.
8. Garau, J., Twynholm, M., García-Mendez, E. *et al.* (2003). Oral pharmacokinetically enhanced co-amoxiclav 2000/125 mg, twice daily, compared with co-amoxiclav 875/125 mg, three times daily, in the treatment of community-acquired pneumonia in European adults. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**, 826–36.
9. Mueller, M., De la Peña, A. & Derendorf, H. (2004). Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 369–77.
10. Azoulay-Dupuis, E., Moine, P., Bedos, J. P. *et al.* (1996). Amoxicillin dose-effect relationship with *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model and roles of in vitro penicillin susceptibilities, autolysis, and tolerance properties of the strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 941–6.

Original

Activity of oral antibiotics against respiratory tract pathogens in Spain

A. Calvo, R. Amores, E. Valero, F. Fuentes, M.L. Gómez-Lus, J. Prieto
and the Working Group for the Study of Cefpodoxime

Department of Microbiology, School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

SUMMARY

The aim of this study was to carry out a nationwide survey to assess the susceptibility of clinical isolates of four respiratory pathogens against nine antibiotics. Eight Spanish centers participated in the study, collecting a total of 977 isolates of Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis. The susceptibility of S. pneumoniae to penicillin was 37.46% susceptible, 30.43% intermediate and 32.11% resistant. MIC₉₀ of all antibiotics against this microorganism were 4–8 mg/l, except cefaclor, cefixime and azithromycin. For S. pyogenes, all the strains were susceptible to penicillins and cephalosporins, and azithromycin was the least active with a rate of resistance of 11.43%. A total of 95 isolates of H. influenzae were betalactamase positive (26.32%). With regard to M. catarrhalis, only penicillin and amoxicillin showed MIC₉₀ ≥ 8 mg/l.

Key words: Susceptibility - Cephalosporins - Cefpodoxime - *S. pneumoniae* - *S. pyogenes* - *H. influenzae*

Actividad de los antibióticos orales frente a los microorganismos patógenos de las vías respiratorias en España

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue realizar una encuesta de ámbito nacional para evaluar la sensibilidad de las cepas clínicas de cuatro microorganismos patógenos respiratorios a nueve antibióticos. En el estudio participaron ocho centros españoles, recogiendo un total de 977 cepas de Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Haemophilus influenzae y Moraxella catarrhalis. El 37,46% de S. pneumoniae fue sensible a la penicilina, el 30,43% mostró resistencia intermedia y el 32,11% fue resistente. Las CMI₉₀ de todos los antibióticos frente a este microorganismo fueron de 4-8 mg/l, excepto para cefaclor, cefixima y azitromicina. En el caso de S. pyogenes, todas las cepas fueron sensibles a la penicilina y las cefalosporinas, mientras que la azitromicina fue el antibiótico menos activo, con un grado de resistencia que alcanzó el 11,43%. Noventa y cinco cepas de H. influenzae fueron betalactamasa positivas (26,32%). En el caso de M. catarrhalis, sólo la penicilina y la amoxicilina tuvieron CMI₉₀ ≥ 8 mg/l.

Palabras clave: Sensibilidad – Cefalosporinas – Cefpodoxima – *S. pneumoniae* – *S. pyogenes* – *H. influenzae*

INTRODUCTION

Resistance of pathogens frequently isolated from community-acquired respiratory tract infections to commonly used antimicrobials has increased exorbitantly in the last two decades (1). For *Streptococcus pneumoniae*, a variable geographical distribution of such resistance is observed, with countries such as Taiwan, Hong Kong, Mexico, the United States, the Slovak Republic, France and Spain showing high rates of penicillin intermediate or fully resistant strains (1-3). In Spain, isolates with penicillin MIC ≥ 0.12 mg/l have increased from 6% in 1979 to over 40% ten years later (4). A recent study reported a 36.5% incidence of fully resistant strains (5).

No less important is the increase in macrolide resistance of this microorganism, which is commonly associated with betalactam resistance (6). Some countries with high rates of penicillin resistance also show high macrolide resistance rates (*i.e.* France, Spain, Hong Kong) (1). However, antimicrobial consumption may also play an important role in this increase, as demonstrated in the case of a region in Italy with high rates of macrolide resistance but low percentages of penicillin resistance (1).

With respect to other microorganisms causing respiratory tract infections, *Haemophilus influenzae* has become important because of the increase in betalactamase-producing strains. Countries such as the United States, Hong Kong, France and Spain again show the highest rates of such isolates, with values around 30% (1). Also of concern is the number of betalactamase-negative and ampicillin-resistant strains, with low rates worldwide (0.3%) though nevertheless indicating the need for caution (1).

In the case of *Streptococcus pyogenes*, which maintains full susceptibility to penicillin, the main problem arises from the increasing rates of macrolide resistance. In Spain, the use of these agents in the treatment of common infections such as pharyngitis has probably led to a 15–25% rate of resistant strains (7-9). This is important because all 14- and 15-membered macrolide agents are affected to the same degree, while miocamycin (a 16-membered ring macrolide) and clindamycin (lincosamide) retain good activity against strains showing the M-phenotype (7).

Finally, *Moraxella catarrhalis* is also an important pathogen, causing infections such as the acute exacerbation of chronic bronchitis and presenting betalactamase production as the only currently known resistance mechanism (1). More than 90% of the strains show this mechanism, though the need for improved knowledge of its susceptibility profile to common antimicrobial agents makes it necessary to include the pathogen in surveillance studies.

Our aim was to carry out a nationwide study in eight centers distributed throughout the country to determine the susceptibility of strains of all these microorganisms to nine antimicrobial agents commonly used in the treatment of community-acquired respiratory tract infections. We included a macrolide (azithromycin), two penicillins (penicillin and amoxicillin), the combination of amoxicillin and clavulanic acid, and five cephalosporins (cefaclor, ceftibuten, cefixime, cefuroxime and cefpodoxime).

MATERIALS AND METHODS

Collaborating centers

Eight Spanish centers were enrolled in the study on the basis of geographical location, as follows: Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge from Barcelona (Dr. R. Martín), Hospital Clínico Universitario from Zaragoza (Dr. R. Gómez-Lus), Hospital Virgen de las Nieves from Granada (Dr. M. De la Rosa), Hospital Universitario “Virgen de la Macarena” from Seville (Dr. E. Perea), Hospital Clínico Universitario from Salamanca (Dr. J.A. García-Rodríguez), Hospital La Fe from Valencia (Dr. M. Gobernado), Hospital Materno Infantil “Teresa Herrera” from A Coruña (Dr. A. Guerrero) and Hospital Clínico San Carlos from Madrid (Dr. J. Prieto). The central laboratory was located (at the Department of Microbiology, School of Medicine, Complutense University in Madrid).

Bacterial isolates

From August 1998 to November 2000 each center was to collect a total of 122 isolates of the following species in the following estimated proportions: *S. pneumoniae* (30–35%), *H. influenzae* (30–35%), *S. pyogenes* (20–25%) and *M. catarrhalis* (10–15%). Depending on the microorganisms, isolates were to be obtained from patients with community-acquired respiratory tract infections, such as pneumonia, acute bronchitis, acute otitis media, tonsillopharyngitis or acute exacerbation of chronic bronchitis. Only sputum, bronchoalveolar lavage, swab or blood culture samples were allowed.

Storage and transport to the central laboratory

After identification, using standard methods to each center, isolates were frozen at -70°C . Transport to the central laboratory in Madrid was done in batches, using inoculated swabs maintained in Amies medium or inoculated

agar plates with the appropriate medium for each microorganism. Once in the central laboratory, isolates were grown in medium and 10 samples of each were frozen at -70°C in skimmed milk until susceptibility determination.

Antimicrobial agents

The following drugs were used in all susceptibility determinations: penicillin V (Sigma-Aldrich S.A., Madrid, Spain), amoxicillin (Sigma-Aldrich S.A., Madrid, Spain), amoxicillin-clavulanic acid (SmithKline Beecham S.A., Madrid, Spain), cefaclor (Sigma-Aldrich S.A., Madrid, Spain), cefixime (Merck Farma y Química S.A., Barcelona, Spain), cefpodoxime-proxetil (Sankyo Pharma GmbH, Munich, Germany), cefuroxime (Sigma-Aldrich S.A., Madrid, Spain), ceftibuten (Schering-Plough, Madrid, Spain) and azithromycin (Pfizer S.A., Madrid, Spain).

Antimicrobial susceptibility tests

MICs were determined using the broth microdilution technique (10), with a final volume of 100 μl and an inoculum of approximately 10^5 CFU/ml. The medium used was cation-adjusted Mueller-Hinton (Difco, Madrid, Spain) supplemented with 2% v/v lysed horse blood (Biomerieux, Madrid, Spain) for *S. pneumoniae* and *S. pyogenes*, *Haemophilus* test medium for *H. influenzae* (10), and Mueller-Hinton for *M. catarrhalis*. This process was performed in triplicate.

After overnight incubation at 35°C in room air for 20–24 hours, endpoints were read visually, determining the MIC as the mode of the three results. Two strains were also assayed for quality control: *S. pneumoniae* ATCC 49619 for *S. pneumoniae*; *S. pyogenes* ATCC 19615 for *S. pyogenes*; and *H. influenzae* ATCC 49247 for *H. influenzae*.

Only MIC tests where control determinations were within the performance range were accepted.

The antimicrobial concentrations assayed were chosen taking into account the expected susceptibility to each microorganism. Breakpoint concentrations used to calculate resistance rates were based on those published by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (10).

Statistical analysis of resistance rates (with *S. pneumoniae* and *S. pyogenes*) and betalactamase production (with *H. influenzae*) in the two-year period of the study was performed by the chi-square test, with Yates correction when necessary (level of significance = 95%).

RESULTS

Number of isolates and geographical distribution

A total of 977 isolates were collected in this study: 299 of *S. pneumoniae* (30.6%), 210 of *S. pyogenes* (21.49%), 361 of *H. influenzae* (36.95%) and 107 of *M. catarrhalis* (10.95%). The percentages of each microorganism were very similar to those expected. Table 1 shows the geographical distribution (number of isolates per center); the largest numbers of isolates were collected from A Coruña and Seville, and the lowest in Granada (107 strains); the mean was approximately 122 strains per center. A total of 37.46% of the strains were isolated in 2000, 55.37% in 1999 and only 7.16% in 1998 or before.

Streptococcus pneumoniae

The susceptibilities of this microorganism to the antimicrobial agents tested are shown in Table 2; isolates were divided according to their susceptibility to penicillin. The overall susceptibility to penicillin was 112 strains sus-

Table 1. Distribution of the isolates in the different centers participating in the study.

Center	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>M. catarrhalis</i>	Total
A Coruña	16	63	46	4	129
Barcelona	41	–	60	20	121
Granada	33	22	43	9	107
Madrid	40	15	32	32	119
Salamanca	53	12	58	2	125
Seville	36	45	47	–	128
Valencia	35	29	30	30	124
Zaragoza	45	24	45	10	124
Total	299	210	361	107	977

Table 2. *In vitro* activities of antimicrobial agents against *S. pneumoniae* (MIC₉₀, range and % of resistant strains). Isolates have been distributed by penicillin susceptibility.

Antimicrobial agent	Penicillin-susceptible n = 112 (37.46%)				Penicillin-intermediate n = 91 (30.43%)				Penicillin-resistant n = 96 (32.11%)				All strains (n = 299)			
	MIC ₉₀ (mg/l)	Range (mg/l)	Resist. (%)		MIC ₉₀ (mg/l)	Range (mg/l)	Resist. (%)		MIC ₉₀ (mg/l)	Range (mg/l)	Resist. (%)		MIC ₉₀ (mg/l)	Range (mg/l)	Resist. (%)	
Penicillin	0.06	0.007–0.06	–		1	0.125–1	–		>8	2–>8	–		4	0.007–>8	32.11	
Amoxicillin	0.25	0.007–1	0.00		1	0.03–4	0.00		8	0.5–>8	13.54		4	0.007–>8	4.35	
Amoxicillin-clav. acid	0.25	0.007–1	0.00		1	0.03–4	0.00		8	0.5–>8	11.46		4	0.007–>8	3.68	
Cefaclor	8	0.25–32	33.04		64	0.06–>128	84.62		>128	2–>128	98.96		128	0.06–>128	69.90	
Cefixime	2	0.03–4	NA*		8	0.06–>8	NA*		>8	0.25–>8	NA*		>8	0.03–>8	NA*	
Cefpodoxime	0.125	0.015–1	0.00		2	0.03–>8	17.58		8	0.06–>8	84.38		4	0.015–>8	32.44	
Cefuroxime	0.25	0.007–8	0.89		4	0.03–8	18.68		8	0.5–>8	87.50		8	0.007–>8	34.11	
Ceftibuten	4	0.06–>8	NA*		8	0.06–>8	NA*		>8	0.25–>8	NA*		8	0.06–>8	NA*	
Azithromycin	0.25	<0.015–>8	5.36		8	<0.015–>8	15.38		>8	<0.015–>8	55.21		>8	<0.015–>8	24.41	

*NA: no breakpoint criteria established by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

ceptible (37.46%), 91 intermediate (30.43%) and 96 resistant (32.11%). By collection dates, in 1999 (n = 166) the penicillin susceptibility was 39.16% susceptible, 24.70% intermediate and 36.14% resistant. In 2000 (n = 110), these rates were 34.55% susceptible, 33.64% intermediate and 31.82% resistant. In 1998 or before, no assessable rates could be calculated owing to the low number of isolates involved (n = 23). No statistically significant differences ($p = ns$) were found between 1999 and 2000 susceptibility rates.

The MIC₉₀ was in the interval of 4–8 mg/l for all agents, with the exception of cefaclor (128 mg/l) and azithromycin (>8 mg/l). Nevertheless, the percentages of resistant strains for each agent according to their NCCLS breakpoints (10) were highly variable: amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid showed the lowest values (4.35 and 3.68% of resistant strains), followed by azithromycin, cefpodoxime and cefuroxime (from 24.41 to 34.11%), and finally cefaclor (69.90%). Both cefixime and ceftibuten lack defined breakpoints.

In the penicillin-susceptible strains, only amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid and cefpodoxime showed 0% resistance, followed by cefuroxime (0.89%). Cefaclor however showed 33.04% resistance. In the penicillin-intermediate strains, only amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid showed 0% resistance; azithromycin, cefpodoxime and cefuroxime showed percentages from 15.38 to 18.68%, while cefaclor reached 84.62%. Finally, in the penicillin-resistant isolates, amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid showed a resistance of 13.54 and 11.46%; the other agents were less active, with percentages of 55.21% for azithromycin, 84.38% for cefpodoxime, 87.50% for cefuroxime and 98.96% for cefaclor. Except for this last agent, the MIC₉₀ were nevertheless approximately the same (8 mg/l). Cefixime and ceftibuten were less active than cefpodoxime and cefuroxime, but more active than cefaclor, when taking into account their MIC₉₀.

Streptococcus pyogenes

Isolates were collected as follows: 69 strains (32.86%) in 2000, 116 (55.24%) in 1999, and 25 (11.90%) in 1998 or before. Table 3 shows the results of MIC determinations for this microorganism. The susceptibility to penicillin was 100%, with a MIC₉₀ of 0.06 mg/l. This same MIC₉₀ was shown by amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid, while cefpodoxime and cefuroxime were one dilution less active (0.125 mg/l). Cefixime MIC₉₀ was similar (0.25 mg/l), but cefaclor and ceftibuten showed higher values (2 and 1 mg/l, respectively).

Table 3. *In vitro* activities of antimicrobial agents against *S. pyogenes* (MIC₅₀, MIC₉₀, range and % of susceptible, intermediate and resistant strains).

Antimicrobial agent	MIC ₅₀ (mg/l)	MIC ₉₀ (mg/l)	Range (mg/l)	% Susc.	% Inter.	% Resist.
Penicillin	0.06	0.06	0.015–0.125	100	0	0
Amoxicillin	0.03	0.06	0.015–0.125	—*	—*	—*
Amoxicillin-clavulanic acid	0.03	0.06	0.015–0.125	—*	—*	—*
Cefaclor	0.5	2	0.06–2	—*	—*	—*
Cefixime	0.125	0.25	0.03–0.5	NA**	NA**	NA**
Cefpodoxime	0.06	0.125	0.015–0.25	—*	—*	—*
Cefuroxime	0.06	0.125	0.015–0.25	—*	—*	—*
Ceftibuten	0.5	1	0.06–4	—*	—*	—*
Azithromycin	0.125	2	0.015–4	80	8.57	11.43

*All the strains susceptible to penicillin can be susceptible to amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefpodoxime, cefuroxime, ceftibuten and cefaclor (ref. 14).

**NA: no breakpoint criteria established by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Finally, azithromycin was the least active (MIC₉₀ = 2 mg/l), with a rate of intermediate and high resistance of 8.57% and 11.43%, respectively. These rates were not statistically different between the years 1999 and 2000 ($p = ns$; strains of 1998 or before were not included due to low frequency). The rates were 81.03% and 78.26% of susceptible strains (in 1999 and 2000, respectively), 6.03% and 8.70% of intermediate strains, and 12.93% and 13.04% of resistant strains.

Haemophilus influenzae

The largest number of isolates collected corresponded to this microorganism. In 2000, a total of 153 (42.38%) strains were sent to the central laboratory; in 1999, 192 isolates (53.19%) were collected, and in or before 1998 the number was 13 (3.60%).

In the overall study, a total of 95 isolates were beta-lactamase positive (26.32%). Comparing the rate of beta-lactamase-positive strains in 2000 *versus* 1999, no statistical differences were found, though the rates in 1999 were approximately 7% higher than in 2000 (30.21 *versus* 22.88%).

Regarding antimicrobial susceptibility (Table 4), the rate of amoxicillin-resistant strains (27.70%, determined with the ampicillin breakpoints) was approximately the same as the betalactamase-positive rate (26.32%). However, six isolates (1.66%) showed betalactamase-negative activity but were fully resistant to amoxicillin (11); another 1.10% of these isolates were intermediately resistant to amoxicillin. All the strains were completely susceptible to all of the antimicrobial agents tested except cefaclor, which showed a low rate of resistant or intermediate strains (1.94% and 3.32%, respectively).

Table 4. *In vitro* activities of antimicrobial agents against *H. influenzae* (MIC₅₀, MIC₉₀, range and % of susceptible, intermediate and resistant strains).

Antimicrobial agent	MIC ₅₀ (mg/l)	MIC ₉₀ (mg/l)	Range (mg/l)	% Susc.	% Inter.	% Resist.
Penicillin	2	>16	0.5–>16	NA*	NA*	NA*
Amoxicillin	0.5	>64	0.125–>64	69.81**	2.49**	27.70**
Amoxicillin-clavulanic acid	0.5	1	0.06–4	100	—	0
Cefaclor	2	8	0.03–64	94.74	3.32	1.94
Cefixime	0.03	0.125	<0.015–0.5	100	—	0
Cefpodoxime	0.06	0.25	0.03–1	100	—	0
Cefuroxime	1	2	0.25–4	100	—	0
Ceftibuten	0.06	0.25	0.03–2	100	—	0
Azithromycin	0.125	0.25	0.03–1	100	—	0

*NA: no breakpoint criteria established by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

**Breakpoint for ampicillin.

Table 5. *In vitro* activities of antimicrobial agents against *M. catarrhalis* (MIC₅₀, MIC₉₀ and range).

Antimicrobial agent	MIC ₅₀ (mg/l)	MIC ₉₀ (mg/l)	Range (mg/l)
Penicillin	8	>16	0.06->16
Amoxicillin	4	8	0.03->8
Amoxicillin-clav. acid	0.125	0.5	0.015-4
Cefaclor	1	4	0.125-8
Cefixime	0.25	0.5	0.06-1
Cefpodoxime	1	2	0.06-2
Cefuroxime	1	4	0.125-4
Ceftibuten	2	4	0.125-8
Azithromycin	0.03	0.06	<0.03-0.125

Moraxella catarrhalis

A total of 107 isolates of this microorganism were collected during the study period. In 2000, 34 strains (31.78%) were isolated *versus* 67 (62.62%) in 2000 and 6 (5.6%) in 1998 or before.

The susceptibility results are shown in Table 5. The most active agent was azithromycin, with a MIC₉₀ of 0.06 mg/l, followed by amoxicillin-clavulanic acid and cefixime (0.5 mg/l). Cefpodoxime showed a MIC₉₀ of 2 mg/l, lower than cefuroxime (4 mg/l) and other oral cephalosporins (ceftibuten and cefaclor), and lower than the values for amoxicillin and penicillin.

DISCUSSION

Resistance of common respiratory tract pathogens to antimicrobial agents has emerged as one of the most important problems in the field of infectious diseases. Since the first penicillin-resistant strains of *S. pneumoniae* were isolated in the 1960s and 70s, the rate of decreased susceptibility has increased worldwide, though geographical variations have been observed (1-3, 12, 13). In Spain, the rate of penicillin resistance (intermediate and high) has increased in the last two decades from approximately 6% (4) to percentages around 60-65% (5). These same values are observed in our study, as well as in another study performed in the Madrid community in 1999 and 2000 (14), although in this survey full resistance was higher (40.6%); these figures show that only one-third of the isolates are susceptible to penicillin. Amoxicillin (with or without clavulanic acid) shows the lowest resistance rates in our study, mainly due to the recent change in breakpoints by the NCCLS (10), which stipulate that values of ≥ 8 mg/l represent resistance rather than ≥ 2 mg/l. Nevertheless, MIC₉₀ values of these agents are equal to that of cefpodoxime (4 mg/l) and

not very different from other cephalosporins such as cefuroxime or ceftibuten (8 mg/l). The most active cephalosporins in terms of resistance rates are cefpodoxime and cefuroxime, with values around 32 and 43%, respectively. In this way, we could grade the activity of oral betalactams in terms of resistance rates, with agents such as amoxicillin (with or without clavulanic acid) being more active than penicillin; cefpodoxime and cefuroxime (and, to a lesser extent, ceftibuten and cefixime) exhibiting rates equivalent to penicillin; and cefaclor with high rates of resistance (twice the penicillin values).

A different issue is the macrolide resistance shown by *S. pneumoniae*. We obtained lower rates with azithromycin (24.41%) than those reported in other studies (1, 5, 14), where rates of 30-35% were observed with both erythromycin and azithromycin in the last four years (1996-2000). It is of interest to point out that in our study, as well as in others (1, 5), macrolide resistance is clearly higher within penicillin-resistant strains: only 5.36% of penicillin-susceptible strains were macrolide resistant, though this rate was 55.21% in the penicillin-resistant isolates. This cross-resistance has been studied and may have an epidemiological justification, since the mechanisms of action of penicillin and the macrolides are different (6, 15).

On the other hand, the rate of resistance of *H. influenzae* to penicillin or aminopenicillins (ampicillin) has also increased during the last two decades (1). In several countries including Spain, the percentage of betalactamase-positive strains is over 30%, though these rates have not changed significantly in the last few years (1, 3). We have found an overall rate of about 26% of these strains, though it is of interest to point out that in 2000 the rate decreased to 22.88% from 30.21% in the previous year. In 1998-1999, Bandak *et al.* (16) showed a 21.80% incidence of betalactamase-positive isolates in Spain. In 1996-1997, other authors in Spain reported rates of 25.7% to 31.7% (1, 17); these figures are not very different from those found in our study in 1999, and are similar to the 30% and 33.3% (Barcelona and Madrid, respectively) reported in a surveillance study in 1992-1993 (18). These results seem to reflect a stagnation in the ampicillin-resistance rate in Spain as well as in other geographical settings.

In terms of antimicrobial activity, cephalosporins are not affected by betalactamases produced by *H. influenzae* and show low MIC₉₀ values. Cefixime, cefpodoxime and ceftibuten showed the lowest values (0.125-0.25 mg/l), while the amoxicillin-clavulanic acid and cefuroxime were less active (1-2 mg/l). However, no resistant strains were observed with any antimicrobial agent except penicillin, amo-

xicillin and cefaclor, this drug showing only a small percentage (94.74% of susceptible strains). Azithromycin was at least as active as cefixime, cefpodoxime or ceftibuten, thus representing a possible alternative treatment in infections caused by this pathogen.

The betalactamase-negative and ampicillin-resistant strains require close observation to avoid a new emergence of resistance. The rate of this type of resistance, probably produced by altered PBPs (11, 18), seems to be low in Spain and in other countries (8). In our study the percentage could be only 1.66% (further identification is required, since ampicillin was not tested). This figure is very close to the 1.8% found in 1996 in Barcelona (1), and lower than the presumable 4.6% found in another multicenter study in 1996–1997 (17). All of our isolates maintained good susceptibility to cephalosporins (except cefaclor) and azithromycin.

With *S. pyogenes*, all the betalactam agents showed good activity, and no resistant strains were found to any of them. In terms of MIC values, penicillin and amoxicillin (with or without clavulanic acid) showed the lowest rates. Within the cephalosporins, cefpodoxime and cefuroxime were more active than the rest (cefixime, cefaclor or ceftibuten). This same situation is also observed in recent studies with this pathogen (8), where MIC₉₀ values were only significantly higher for cefaclor (≤ 1 mg/l versus 2 mg/l in our study). Macrolides, however, showed a 20% resistance (intermediate and high resistance with azithromycin). Here our percentages of susceptible strains are higher than in other studies reporting rates of 72.9 to 76.5% (7, 8), though the former was versus erythromycin (which is a little less active than azithromycin).

Finally, *M. catarrhalis* in our study showed a susceptibility pattern very similar to that obtained in other studies (1, 16). Since the only currently known resistance mechanism shown by this pathogen is the production of betalactamase (almost 100% of isolates in Spain), the most active agents were azithromycin and amoxicillin-clavulanic acid. However, cefixime (and to a lesser extent cefpodoxime) retained acceptable activity against this microorganism, with MIC₉₀ ≤ 2 mg/l.

In conclusion, the issues regarding respiratory pathogens and resistance to antimicrobial agents should be subjected to continuous surveillance. Concerning *S. pneumoniae* resistance to penicillin, the reports from 1996 to 2000 may reflect a stabilization of the rates of non-susceptible strains in Spain at around 30–40%, with obvious geographical variations. There also appears to be a stabilization in the rate of betalactamase-positive *H. influenzae* strains at about 20–30%, though betalactamase-negative and ampi-

cillin-resistant rates should be carefully detected and monitored to identify any rapid increase. This same procedure may be necessary in the case of *S. pyogenes* and macrolide resistance, since the rates of non-susceptibility of this pathogen to agents like azithromycin could increase if parameters such as consumption continue to rise (8).

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from Sankyo Pharma Spain. The authors thank the participating centers for their support and in particular Dr. R. Martín (Barcelona), Dr. R. Gómez-Lus (Zaragoza), Dr. M. De la Rosa (Granada), Dr. J.A. García-Rodríguez (Salamanca), Dr. M. Gobernado (Valencia), Dr. E. Perea (Seville) and Dr. A. Guerrero (A Coruña). Special thanks are also due to Ana Ojanguren of Sankyo Pharma Spain for her important assistance in the development of this study.

Correspondence: Dr. José Prieto, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34-91-394-15-11; Fax: 34-91-394-15-11; e-mail: jprieto@med.ucm.es

REFERENCES

1. Felmingham, D., Gruneberg, R.N. *The Alexander project 1996-1997: Latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 45: 191-203.
2. Hsueh, P., Liu, Y., Shyr, S. et al. *Multicenter surveillance of antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis in Taiwan during the 1998-1999 respiratory season*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1342-1345.
3. Thomsberry, C., Ogilvie, P.T., Holley, H.P., Sahm, D.F. *Survey of susceptibilities of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis isolates to 26 antimicrobial agents: A prospective U.S. study*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2612-2623.
4. Fenoll, A., Burgon, C.M., Muñoz, R., Vicioso, D., Casal, J. *Serotype distribution and antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989*. Rev Infect Dis 1991; 13: 56-60.
5. Baquero, F., García-Rodríguez, J.A., García de Lomas, J., Aguilar, L. and the Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. *Antimicrobial resistance of 1113 Streptococcus pneumoniae isolates from patients with respiratory tract infections in Spain: Results of a 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 357-359.
6. Granizo, J.J., Aguilar, A., Casal, J., García-Rey, C., Dal-Re, R., Baquero, F. *Streptococcus pneumoniae resistance to erythromycin and penicillin in relation to macrolide and beta-lactam consumption in Spain (1979-1997)*. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 767-773.
7. Alós, J.I., Aracil, B., Oteo, J., Torres, C., Gómez-Garcés, J.L. *High prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin/miocomycin-susceptible (M phenotype) Streptococcus pyogenes: Results of a Spanish multicentre study in 1998*. Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 605-609.

8. Baquero, F., García-Rodríguez, J.A., García de Lomas, J., Aguilar, L. and the Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. *Antimicrobial resistance of 914 beta-hemolytic streptococci isolated from pharyngeal swabs in Spain: Results of a 1-year (1996–1997) multicenter surveillance study*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 178-180.
9. Romero-Vivas, J., Rubio Alonso, M., Corral, O., Pacheco, S., Agudo, E., Picazo, J.J. *Estudio de las infecciones respiratorias extrahospitalarias*. Enferm Infec Microbiol Clin 1997; 15: 289-298.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Approved Standard M7-A5. NCCLS, Wayne, Pa 2000.
11. Barry, A.L., Fuchs, P.C., Brown, S.D. *Identification of β -lactamase-negative, ampicillin-resistant strains of Haemophilus influenzae with four methods and eight media*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1585-1588.
12. Baquero, F., Martínez-Beltrán, J., Loza, E. *A review of antibiotic resistance patterns of Streptococcus pneumoniae in Europe*. J Antimicrob Chemother 1991; 28 (Suppl. C): 31-38.
13. Blondeau, J.M., Suter, M., Borsos, S. and The Canadian Antimicrobial Study Group. *Determination of the antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae and Moraxella catarrhalis*. J Antimicrob Chemother 1999; 43 (Suppl. A): 25-30.
14. Oteo, J., Alós, J.I., Gómez-Garcés, J.L. *Antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae isolates in 1999 and 2000 in Madrid, Spain: A multicentre surveillance study*. J Antimicrob Chemother 2001; 47: 215-218.
15. Thornsberry, C., Jones, M.E., Hickey, M.L., Mauriz, Y., Kahn, J., Sahm, D.F. *Resistance surveillance of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis isolated in the United States, 1997-1998*. J Antimicrob Chemother 1999; 44: 749-759.
16. Bandak, S.I., Turnak, M.R., Allen, B.S. et al. *Antibiotic susceptibilities among recent clinical isolates of Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis from fifteen countries*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 55-60.
17. García-Rodríguez, J.A., Baquero, F., García de Lomas, J., Aguilar, L. *Antimicrobial susceptibility of 1422 Haemophilus influenzae isolates from respiratory tract infections in Spain. Results of a 1-year (1996-97) multicenter surveillance study*. Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Infection 1999; 27: 265-267.
18. Doern, G.V. and The Alexander Project Collaborative Group. *Antimicrobial resistance among lower respiratory tract isolates of Haemophilus influenzae: Results of a 1992-93 Western Europe and USA collaborative surveillance study*. J Antimicrob Chemother 1996; 38 (Suppl. A): 59-69.